

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-046053

(43)Date of publication of application : 20.02.2001

---

(51)Int.Cl.

C12N 1/15

C12N 5/10

C12N 15/09

---

(21)Application number : 11-228915

(71)Applicant : KIKKOMAN CORP

(22)Date of filing : 12.08.1999

(72)Inventor : HATAMOTO OSAMU

MATSUSHIMA KENICHIRO

TAKAHASHI OSAMU

UMITSUKE GENRYU

ABE TAKAYOSHI

---

(54) MODIFICATION OF GENOME TARGET SITE OF MULTINUCLEATED CELL,  
TARGETING VECTOR USED THEREFOR AND MODIFIED MULTINUCLEATED CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a target vector for modifying genome target site of a multinucleated cell, suitable for creating gene-cleaved strain by including a DNA containing modified target site or the like.

SOLUTION: This targeting vector contains (A) a target site of a gene or the like encoding modified enzyme, peptide hormone, enzyme corresponding to a synthetic system of a biologically active substance or enzyme corresponding to a toxin-biosynthesizing system, (B) a recombinant section marker comprising a positive section marker and a negative section marker, and (C) a marker for controlling the copy number encoding an enzyme selected from a group of a laccase, a  $\beta$ -galactosidase, a  $\beta$ -glucuronidase and an alkaline phosphatase. The multinucleated cell is preferably the one derived from an organism belonging to the genus selected from Aspergillus, Penicillium, Neurospora and Fusarium.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 04.03.2005

[Date of sending the examiner's decision of  
rejection]

[Kind of final disposal of application other than

the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-46053

(P2001-46053A)

(43)公開日 平成13年2月20日 (2001.2.20)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 12 N 1/15  
5/10  
15/09

識別記号

F I

C 12 N 1/15  
5/00  
15/00

マーク\* (参考)

4 B 0 2 4  
B 4 B 0 6 5  
A

審査請求 未請求 請求項の数23 O L (全 29 頁)

(21)出願番号

特願平11-228915

(22)出願日

平成11年8月12日 (1999.8.12)

(71)出願人 000004477

キッコーマン株式会社  
千葉県野田市野田250番地

(72)発明者 畑本 修

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内

(72)発明者 松島 健一朗

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多核細胞のゲノムターゲット部位の改変方法、それに使用するためのターゲティングベクター、  
および改変された多核細胞

(57)【要約】

【課題】 多核細胞のゲノムターゲット部位を遺伝子タ  
ーゲティング法により改変する方法を提供する。

【解決手段】 a.改変されたターゲット部位と、b.相同  
組み換え体セレクションマーカーと、c.コピー数コント  
ロール用マーカーとを含有するDNAを含む、多核細胞  
のゲノムターゲット部位を改変するためのターゲティン  
グベクター、その製法、このベクターを用いる多核細胞  
の改変方法、ならびに改変された多核細胞。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 a. 改変されたターゲット部位と、b. 相同組み換え体セレクションマーカーと、c. コピー数コントロール用マーカーとを含有するDNAを含む、多核細胞のゲノムターゲット部位を改変するためのターゲティングベクター。

【請求項2】 相同組み換え体セレクションマーカーが、ポジティブセレクションマーカーおよびネガティブセレクションマーカーからなることを特徴とする請求項1記載のターゲティングベクター。

【請求項3】 コピー数コントロール用マーカーが、その発現が以下のいずれかの方法：1. 細胞の薬剤感受性試験、2. 細胞の生育速度、3. 酵素活性試験、4. 光\*

【化1】

ターゲット部位	コピー数コントロール用マーカー	ポジティブセレクションマーカー	ターゲット部位	ネガティブセレクションマーカー
—	—	—	—	—

## ※※【化2】

ターゲット部位	ポジティブセレクションマーカー	コピー数コントロール用マーカー	ターゲット部位	ネガティブセレクションマーカー
—	—	—	—	—

【請求項6】 以下のDNA構造を有することを特徴とする請求項5記載のターゲティングベクター。 ★【化3】 ★

ターゲット部位	タンナーゼプロモーター	ラツカーゼ	タンナーゼタミネーター	pyrG	ターゲット部位	olIC31
—	—	—	—	—	—	—

(ここで、pyrGはオロチジン-5'一ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子、olIC31はオリゴマイシン耐性ATシンターゼサブユニット9遺伝子を示す。)

【請求項7】 ターゲット部位が、酵素、ペプチドホルモン、生理活性物質生合成系関連酵素またはトキシン生合成系関連酵素をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項1記載のターゲティングベクター。

【請求項8】 多核細胞が糸状菌または担子菌に属する生物由来であることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載のターゲティングベクター。

【請求項9】 多核細胞において、所望のコピー数のターゲット部位を改変する方法であって、

(1) 以下のa～cを含むDNA構造を宿主細胞に導入する工程

a. 改変されたターゲット部位、  
b. 相同組み換え体セレクションマーカーおよび  
c. コピー数コントロール用マーカー；

(2) 相同組み換え体セレクションマーカーの発現を指標として相同組み換え体を選抜し、1コピー以上のターゲット部位が改変されている細胞を得る工程；および

(3) 得られた相同組み換え体について、コピー数コントロール用マーカーの発現を指標として選抜を行ない、

所望のコピー数のターゲット部位が改変されている細胞を得る工程を含む、前記方法。

【請求項10】 (1)の工程が、請求項1～8のいずれかに記載のターゲティングベクターを、宿主細胞に導入する工程であることを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】 (3)の工程が、  
a. 得られた相同組み換え体を培地に播種し、  
b. コピー数コントロール用マーカーの発現が最も強い細胞を選抜し、

c. 選抜された細胞を培養培地に播種し、および  
d. 1つの細胞から得られる子孫の細胞の全てが、等しい強度でコピー数コントロール用マーカーを発現するようになるまで、a～cの操作を繰り返すことからなることを特徴とする請求項9または10記載の方法。

【請求項12】 (1)～(3)の工程に加えて、  
(4) ターゲット部位に導入されたターゲティングベクター由来のDNA領域を除去する工程を含む、請求項9～11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】 多核細胞が糸状菌に属する生物由来であることを特徴とする請求項9～12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】 多核細胞が、アスペルギルス属、ベニシリウム属、またはノイロスピラ属、フザリウム属のいずれかに属する生物由来であることを特徴とする請求項13記載の方法。

【請求項15】 請求項1～8のいずれかに記載のターゲティングベクターを宿主細胞に導入することにより、ターゲット部位のうち、1コピー～全コピーのターゲット部位が改変されている多核細胞。

【請求項16】 請求項9～12のいずれかに記載の方法により、ターゲット部位のうち、1コピー～全コピーのターゲット部位が改変されていることを特徴とする請求項15記載の多核細胞。

【請求項17】 糸状菌または担子菌由来であることを特徴とする請求項15または16記載の多核細胞。

【請求項18】 マイコトキシンの生合成に関与する一つあるいは複数の酵素の遺伝子の全コピーが破壊されているアスペルギルス・オリゼまたはアスペルギルス・ソーヤから選択される微生物細胞。

【請求項19】 請求項9～12のいずれかに記載の方法によりマイコトキシンの生合成に関与する一つあるいは複数の酵素の遺伝子の全コピーが破壊されているアスペルギルス・オリゼまたはアスペルギルス・ソーヤから選択される微生物細胞。

【請求項20】 請求項1～8のいずれかに記載のターゲティングベクターの製造方法であって、ターゲット部位を導入するための少なくとも1つの制限酵素部位を含むリンカーと相同組み換え体セレクションマーカーとコピー数コントロール用マーカーとを含有するDNAを含む中間体ベクターを該制限酵素部位で酵素的に切断し、その切断部位に該ターゲット部位を導入することを含む、前記方法。

【請求項21】 ターゲット部位を導入するための少なくとも1つの制限酵素部位を含むリンカーと、相同組み換え体セレクションマーカーと、コピー数コントロール用マーカーとを含有するDNAを含む中間体ベクター。

【請求項22】 請求項1～8のいずれかに記載のターゲティングベクターの、多核生物における特定遺伝子の機能を調べるための使用。

【請求項23】 多核生物において染色体中の前記ベクターの組み込みの結果喪失する機能を同定することを含む請求項2記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、多核細胞において、所望のコピー数のゲノムターゲット部位を改変する方法、それに使用するターゲティングベクター、その製法、およびターゲット部位が改変された多核細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】 微生物は、各種産業分野、例えば発酵食

品や医薬品等の製造現場において広く使用されている。従来より、微生物の細胞中のDNA構造のうち、所望の部位（ターゲット部位）を改変して有用な細胞を得る方法が種々開発されている。遺伝子工学的手法によるターゲット部位の改変は、特定の遺伝子発現の活性化や不活性化、細胞の形質・物質生産性の改善、等を目的として、各種産業分野において広く行われている。

【0003】 染色体上のターゲット部位を改変する方法としては、例えば、ターゲティングベクターを用いて相

10 同組み換えの原理によりターゲット部位を改変する方法（以下「遺伝子ターゲティング法」）が知られている。遺伝子ターゲティング法を用いて特定の遺伝子発現を不活性化する技術は、遺伝子破壊法とよばれ、すでに動物細胞、酵母、糸状菌等の系では、遺伝子破壊株あるいは遺伝子欠失株が作出されている。

【0004】 産業上用いられる微生物のなかには、細胞中に複数の核を含む生物、すなわち多核細胞（multinucleate cell）からなる生物（多核細胞生物）があり、食品、医療、基礎研究の現場で広く使用されており産業上有用な微生物である。しかし、多核細胞の核をたとえば遺伝子ターゲティング法などの技術により改変したという例は極めて少ない。とりわけ以下のものが知られている。

【0005】 (1) Transformation of *Aspergillus flavus* : construction of urate oxidase-deficient mutants by gene disruption. Laurent Chevalet et.al. Curr Genet (1992) 21:447-453: (1) ではアスペルギルス・フラバスを宿主にuaz遺伝子 (urate oxidase-encoding gene) 破壊を行い、目的の株をプレートアッセイにより

30 検定し、最終的にurate oxidase活性の測定とサザン解析によりuaz遺伝子破壊を確認している。また、アスペルギルス属は胞子の段階では単核（細胞内に一つの核が存在）であるので、容易にheterokaryonの株（異なる種類の核が細胞内に混在する株）からhomokaryonの株（同一種類の核が細胞内に存在する株）を選択できると記載されている。しかしながら、アスペルギルス属のすべての糸状菌が、単核の胞子を作るわけではなく、例えば、アスペルギルス・オリゼ（A・オリゼ）あるいはアスペルギルス・ソーヤ（A・ソーヤ）の胞子は多核の状態である（Ushijima S. Agric.Biol.Chem., 54(7), 1667-1676, 1990. Ushijima S. Agric.Biol.Chem., 51 (4), 1051-1057, 1987）。

【0006】 また、本報引例 (Fincham JRS(1989) Microbiol. Rev. 53:148-170) に記載の通り、胞子が多核の状態である多核生物での遺伝子破壊株の選択は、破壊された遺伝子に由来する表現型の変化（形態、酵素活性、薬剤耐性、栄養要求性等）を指標にシングルコロニーアイソレーションをくり返すしかなく、細胞中のすべての核が目的の核で占められているか否かを容易に検定する方法は開発されていない。特に、遺伝子破壊のターゲッ

ト遺伝子が、活性測定が容易でないタンパク質をコードする遺伝子あるいはサイレントな遺伝子の場合の遺伝子破壊はさらに困難となる。

【0007】(2)Transcription stimulates homologous recombination in mammalian cells. Nickoloff JA et al. Mol. Cell. Biol., Sep. 10(9) 1990, p. 4837-4845

(2)では酵母あるいは哺乳動物において遺伝子の相同組み換えが起こる場合、転写が起こっている遺伝子は、転写されていない遺伝子にくらべて相同組み換えが起こる頻度が高いことが記載されている。

【0008】すなわち、サイレントな遺伝子の破壊を行う場合、破壊した遺伝子に由来する表現型の変化で遺伝子破壊株の選択を行うことが出来ないだけでなく、相同組み換えの起こる頻度が低いために目的の遺伝子破壊株の作出がより困難となる。多核細胞のサイレント遺伝子を破壊する場合も、相同組み換え効率の低下が予想される。

【0009】(3)Characterization of Polyketide Synthase Gene(pksL1) Required for Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. Guo Hong Feng et al. 1. Journal of Bacteriology, Nov. 1995, p6246-6254

(4)avnA, a Gene Encoding a Cytochrome P-450 Monooxygenase, Is Involved in the Congression of Averantin to Averufin in Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. Jiujiang Yu et al. Appl. Environ. Microbiol., Apr. 1997, p.1349-1356

(5)Structural and Functional Analysis of the nor I Gene Involved in the Biosynthesis of Aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*. Frances Trail et al. Appl. Environ. Microbiol., Nov. 1994, p. 4078-4085

(3)、(4)、(5)は、アフラトキシン生合成系関連遺伝子であるpksL1, avnA, nor I が破壊されたアスペルギルス・パラスティカス (A・パラスティカス) の育種に関する。目的の遺伝子破壊株の選択法は、煩雑な方法である薄相クロマトグラフィー、プレートアッセイ法およびサザン解析法である。

【0010】また、A・パラスティカスでは、これらの遺伝子は実際に転写されているアクティブな遺伝子である。一方、後述の通り、A.オリゼあるいはA.ソーヤにおいてはアフラトキシン生合成系関連遺伝子であるpksA, nor I, avnA等はサイレントな遺伝子である。これらの遺伝子の破壊を行う場合プレートアッセイ法によるスクリーニングが不可能であり、破壊株の取得は非常に困難である。さらにまた、多核細胞のターゲット部位を遺伝子ターゲティング法により改変しようとする場合には、種々の課題を解決する必要がある。

【0011】例えば、多核細胞中に複数コピー存在するターゲット部位の全てを改変しなければならない場合がある。食品醸造分野では、食品の風味を低下させる物質の生成に関与する酵素を不活化したいという要望があ

る。このような場合、問題となる酵素の遺伝子を不活化した遺伝子破壊株を作出するが、その際は、ターゲット部位となる遺伝子の1コピーのみならず、全コピーを不活化することが望ましい。

【0012】また、多核細胞を培養して有用物質の生産を行なう場合、該物質の生合成に関与する酵素の遺伝子の発現を向上させるため、遺伝子ターゲティング法を用いて耐熱性や触媒活性等を向上させた酵素遺伝子、あるいは改変された遺伝子発現調節部位を宿主細胞に導入する。この場合も、ターゲット部位の全コピーを改変することが望ましい。さらには、多核細胞の使用の目的によっては、複数コピー存在するターゲット部位のうち、所望のコピー数のターゲット部位を改変する場合もある。

【0013】多核細胞のターゲット部位を改変する場合には、以下のような問題点がある。

(1) ターゲット部位の全コピーが改変されていることの確認は、通常はサザン解析法またはPCR法により行なう。これらの方法では、改変されたターゲット部位に比べ、未改変のターゲット部位がごく少数存在する場合、その改変状態を検出することが困難である。

(2) ターゲット部位の全コピーが改変されていない場合、形質転換の際、ベクターの導入に用いたマーカーを維持するための選択圧をかけていない状態では、改変されたターゲット部位を含む核の欠落が起こる場合がある。

(3) 非相同組み換えの頻度が高いことから、微生物を利用するうえで好ましくない部位で組み換えが起こることがある。

【0014】(4)所望のコピー数のターゲット部位が改変された細胞を選択するのが困難である。

(5) 多核細胞では細胞複製の際、複製されたそれぞれの核の染色体が均等に娘細胞へ分配されるわけではない。このため、ターゲット部位の全コピーが改変されていない細胞を継代培養した場合、改変されたターゲット部位を含む核が存在しない細胞が現れる頻度が高い。技術的な問題により、糸状菌をはじめとする多核生物においては、ターゲット部位を簡便かつ高頻度に改変する方法は確立されていなかった。このため、全てのコピーのターゲット部位を改変した多核細胞を得ることは非常に困難であった。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、

(1) 多核細胞の所望のゲノムターゲット部位を改変するためのターゲティングベクター；

(2) そのようなターゲティングベクターを製造する方法；

(3) 多核細胞のゲノムターゲット部位を改変する方法；

(4) ターゲット部位が改変された多核細胞；および

(5) ターゲティングベクターを製造するための中間体

ベクターを提供することである。

【0016】本発明により例えば以下のことことが可能となる。

(1) 生活環に単核相を持たない多核生物においても容易に遺伝子破壊を行うことができる。

(2) 相同組み換え体セレクションマーカー、特に、ポジティブセレクションマーカーおよびネガティブセレクションマーカーの働きにより、形質転換体の中から効率的に、相同組み換えにより目的遺伝子が破壊された株をスクリーニングできる。

(3) 効率的にサイレントな遺伝子が破壊された株を作出することができる。

【0017】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、多核細胞のターゲット部位を改変する方法について鋭意検討を行ない、以下に記載する本発明を完成した。すなわち本発明は、a.改変されたターゲット部位と、b.相同組み換え体セレクションマーカーと、c.コピー数コントロール用マーカーとを含有するDNAを含む、多核細胞のゲノムターゲット部位を改変するためのターゲティングベクターを提供する。

【0018】本明細書中、「ターゲット部位」とは、多核細胞の染色体（すなわちゲノム）上に存在する塩基配列のうちの任意の部位を指す。また、「改変されたターゲット部位」とは、上記ターゲット部位の塩基配列において、1または複数の塩基に、置換、欠失、挿入または付加の変異を導入しているものを指す。

\* 【0019】また本明細書中、「相同組み換え体セレクションマーカー」とは、ターゲティングベクターが、相同組み換えの原理により宿主細胞に導入されたか否かを確認するためのマーカーを指す。さらに本明細書中、「コピー数コントロール用マーカー」とは、細胞中に複数コピー存在するターゲット部位のうち、改変されている割合を確認するためのマーカーを指す。

【0020】本発明の実施態様において、相同組み換え体セレクションマーカーは、ポジティブセレクションマーカーおよびネガティブセレクションマーカーでありうる。本発明の別の実施態様において、コピー数コントロール用マーカーは、その発現が以下のいずれかの方法、すなわち細胞の薬剤（ブレオマイシン等）感受性試験、細胞の生育速度、酵素活性試験、光学的方法または栄養要求性試験により観察できるようなポリペプチドをコードするDNAでありうる。具体的には、そのようなコピー数コントロール用マーカーは、ラッカーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼおよびアルカリフェオスマーカーからなる群から選択される酵素をコードしているDNAを例示できる。

【0021】本発明のさらに別の実施態様において、ターゲティングベクターは以下の(1)または(2)のいずれかのDNA構造を含むことができる：

(1)

【0022】

【化4】

ターゲット部位	コピー数コントロール用マーカー	ポジティブセレクションマーカー	ターゲット部位	ネガティブセレクションマーカー
---------	-----------------	-----------------	---------	-----------------

(2)

【0023】

※【化5】

※

ターゲット部位	ポジティブセレクションマーカー	コピー数コントロール用マーカー	ターゲット部位	ネガティブセレクションマーカー
---------	-----------------	-----------------	---------	-----------------

さらに具体的には以下のDNA構造を有するターゲティングベクターを例示することができる：

★【0024】

★【化6】

ターゲット部位	タンナーゼプロモーター	ラッカーゼ	タンナーゼターミネーター	pyrG	ターゲット部位	olIC31
---------	-------------	-------	--------------	------	---------	--------

【0025】(ここで、pyrGはオロチシン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子、olIC31はオリゴマイシン耐性ATPシンターゼサブユニット9遺伝子を示す。)本発明において、ターゲット部位は以下のいずれかの遺伝子：

(1) サイレント遺伝子、(2) その発現の観察が困難である遺伝子、または(3) 機能未知の遺伝子領域であ

りうる。

【0026】本明細書中、「サイレント遺伝子」とは、通常細胞内で発現していない遺伝子をいう。また、「その発現の観察が困難である遺伝子」とは、検出技術などの点で発現の同定が難しい遺伝子を指す。さらに「機能未知の遺伝子領域」とは、コードされているタンパク質の機能が知られていない遺伝子領域、あるいは機能が十

分に解明されていない遺伝子領域（例えば、染色体上に存在する転写に関与するシスエレメント等）を指す。

【0027】或いは、本発明において、ターゲット部位は、酵素、ペプチドホルモン、細胞骨格構成タンパク質、生理活性物質生合成系関連酵素またはトキシン生合成系関連酵素をコードする遺伝子を例示することができる。本発明のベクターは通常プラスミドベクターであるが、これに限定されない。例えば本発明のターゲティングベクターを構築するために使用可能なベクターとしては、例えばpUC118、pBR322、pUC18等を挙げることができる。

【0028】本発明の別の実施態様において、多核細胞は糸状菌または担子菌に属する生物由来でありうる。本発明はまた、別の態様において、多核細胞において、所望のコピー数のターゲット部位を改変する方法であつて、

(1) 以下のa～cを含むDNA構造を宿主細胞に導入する工程

a. 改変されたターゲット部位、

b. 相同組み換え体セレクションマーカーおよび

c. コピー数コントロール用マーカー；

(2) 相同組み換え体セレクションマーカーの発現を指標として相同組み換え体を選抜し、1コピー以上のターゲット部位が改変されている細胞を得る工程；および

(3) 得られた相同組み換え体について、コピー数コントロール用マーカーの発現を指標として選抜を行ない、所望のコピー数のターゲット部位が改変されている細胞を得る工程、を含む、前記方法を提供する。

【0029】本発明の実施態様において、上記方法中の(1)の工程は、上記定義のターゲティングベクターを宿主細胞に導入する工程を含みうる。本発明の別の実施態様において、上記方法中の(3)の工程は、

a. 得られた相同組み換え体を培地に播種し、

b. コピー数コントロール用マーカーの発現が最も強い細胞を選抜し、

c. 選抜された細胞を培養培地に播種し、および

d. 1つの細胞から得られる子孫の細胞の全てが、等しい強度でコピー数コントロール用マーカーを発現するようになるまで、a～cの操作を繰り返すことを含みうる。

【0030】本発明のさらに別の実施態様において、上記方法における多核細胞は糸状菌または担子菌に属する生物由来でありうる。具体的には、多核細胞として、アスペルギルス属、ペニシリウム属、ノイロスボラ属、またはフザリウム属のいずれかに属する生物細胞を例示できる。

【0031】本発明はさらに、別の態様において、上記定義のターゲティングベクターを宿主細胞に導入することにより、ターゲット部位のうち、1コピー～全コピーのターゲット部位が改変されている多核細胞を提供す

る。本発明の実施態様において、多核細胞は、上記の方法より、ターゲット部位のうち、1コピー～全コピーのターゲット部位が改変されているものを例示できる。

【0032】本発明の別の実施態様において、多核細胞は糸状菌または担子菌由来でありうる。本発明は、さらに別の態様において、マイコトキシンの生合成に関与する一つあるいは複数の酵素の遺伝子の全コピーが破壊されているA・オリゼまたはA・ソーヤから選択される微生物細胞を提供する。あるいは、本発明は、上記の方法

10 によりマイコトキシンの生合成に関与する一つあるいは複数の酵素の遺伝子の全コピーが破壊されているA・オリゼまたはA・ソーヤから選択される微生物細胞を提供する。

【0033】本発明でいう「多核細胞」とは、1つの細胞中に2個以上の核が存在する細胞を意味する。本発明はさらに、本発明の上記ターゲティングベクターの製造方法であつて、ターゲット部位を導入するための少なくとも1つの制限部位を含むリンカーと相同組み換え体セレクションマーカーとコピー数コントロール用マーカーとを含有するDNAを含む中間体ベクターを該制限部位で酵素的に切断し、その切断部位に該ターゲット部位を導入することを含む方法を提供する。

【0034】本発明はさらに、ターゲット部位を導入するための少なくとも1つの制限部位を含むリンカーと、相同組み換え体セレクションマーカーと、コピー数コントロール用マーカーとを含有するDNAを含む中間体ベクターを提供する。本発明はさらに、本発明の上記ターゲティングベクターの、多核生物における特定遺伝子の機能を調べるための使用を提供する。この使用方法には多核生物における染色体中への該ベクターの組み込みの結果喪失する機能を同定することを含む。

【0035】

【発明の実施の形態】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

#### 1. 本発明のターゲティングベクター

本発明のターゲティングベクターは、多核細胞において、該細胞の染色体上のターゲット部位を改変するためのものである。

【0036】多核細胞は、上記定義のとおり、1つの細胞中に2個以上の核が存在する細胞であればよく、特に限定されるものではない。多核細胞生物としては、例えば糸状菌、担子菌、子のう菌、等に分類されている微生物、例えばアスペルギルス属、ペニシリウム属、ノイロスボラ属、フザリウム属に属する微生物、あるいは*Scutellospora castanea*等を例示することができる。とりわけ、アスペルギルス属に属する微生物としては、例えばA・オリゼ、A・ソーヤ、A・バラスティカス、A・フーバス、アスペルギルス・ニーデュランス (A・ニーデュランス)、アスペルギルス・フミガタス (A・フミガタス) 等を挙げることができる。A・ニーデュランスは

細胞中に核が1個存在する生活相（単核相）と核が複数個存在する生活相（多核相）とを有するが、本発明でいう多核細胞生物には、細胞中の核が常に複数個存在する生物のみならず、生活相の一部に多核相を有する生物も含まれる。

【0037】本発明のベクターの使用により、多核細胞中の全コピーあるいは所望のコピー数のターゲット部位を改変することができる。改変方法は、一般的な相同組み換えの原理により、前記ベクター中の改変ターゲット部位を宿主細胞である多核細胞に導入することによって実施することができる。

【0038】本発明のターゲティングベクターは、以下の3種のDNA構造：

a.改変されたターゲット部位、b.相同組み換え体セレクションマーカーおよびc.コピー数コントロール用マーカー、を含むことによって特徴付けられる。これらのエレメントの配置には、特に制限はなく、考えうるいかなる配置でもよい。ベクターは、必要に応じて、プロモーター、ターミネーター等の調節配列、複製開始点などを含むことができる。

【0039】本発明におけるターゲット部位は、多核細胞の染色体上に存在する塩基配列のうちの任意の部位であり、多核細胞を使用する目的により適宜選択すればよい。ターゲット部位としては、例えば、各種酵素・ペプチドの構造遺伝子（例えば種々の酵素類やペプチドホルモン類、細胞骨格構成タンパク質、等をコードする遺伝子）、遺伝子発現調節部位（プロモーター、オペレーター、エンハンサー、ターミネーター等）、介在配列（イントロン）、テロメア、セントロメア等に該当するDNA領域またはその近傍の領域が挙げられる。また、ターゲット部位としては、機能未知の遺伝子領域も選択可能である。

【0040】酵素としては、特に限定されないが、例えば、プロテアーゼ、セルラーゼ、ラクターゼ、グルコースオキシダーゼ、ペクチナーゼ、カタラーゼ、アミラーゼ、リバーゼ、抗生物質生合成系関連酵素、トキシン生合成系関連酵素等が挙げられる。プロテアーゼとしては、酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ等が挙げられる。トキシン生合成系関連酵素としては、オクラトキシン（アスペルギルス属）、トリコテセン（トリコデルマ属）、アフラトキシン（アスペルギルス属）等の生合成関連酵素が挙げられ、具体的には、diacylglycerol lipase, ketoreductase, C-15 hydroxylase等が挙げられる。抗生物質生合成系関連酵素としては、acvA(delta-(L-alpha-animo adipyl)-L-cystein yl-D-valine synthetase)、ipnA(isopenicillin-N-synthetase)等の生合成関連酵素が挙げられる。

【0041】ターゲット部位は、通常細胞内で発現していない遺伝子（サイレント遺伝子という）であってもよい。A・オリゼあるいはA・ソーヤにおけるサイレント

遺伝子としては、pksA, nor1, ver1, aflR等が挙げられる。これらの遺伝子はA・バラスティカスやA・フラバスではアフラトキシン生合成系関連酵素として機能する遺伝子であるが、一方A・オリゼあるいはA・ソーヤでは該遺伝子は発現していないためサイレント遺伝子であり、これらの微生物はアフラトキシン非生産株である。サイレント遺伝子に対し遺伝子を破壊するような改変を加えることにより、A・オリゼあるいはA・ソーヤのアフラトキシン非生産性をより確実にすることができる。

【0042】また、ターゲット部位としては、改変の結果が容易に観察できない領域を選択することができる。例えば、その発現の観察が困難である遺伝子領域をターゲット部位とした場合、該ターゲット部位が改変された株を取得することは従来の技術では非常に困難であるが、本発明の方法により、そのような株の取得は非常に容易になる。あるいは、多核細胞の遺伝子領域のすべてのコピーが改変された場合に、その細胞が致死となる遺伝子領域をターゲット部位とする場合においても、本発明の方法を用いることは非常に有用である。

【0043】さらに、ターゲット部位としては機能未知の遺伝子領域を選択することができ、本発明により該領域の改変によりその遺伝子の機能解析を行うことも可能である。したがって、本発明のターゲティングベクターはそのようなターゲット部位を改変する場合にも非常に有用である。

【0044】本発明における「改変されたターゲット部位」とは、上記ターゲット部位の塩基配列において、1または複数の塩基に、置換、欠失、挿入または付加の変異を導入しているものをいう。ターゲット部位を改変するためには、従来公知の遺伝子工学的手法（例えば、部位特異的変異誘発法、PCR法など）を用いることができる。例えば、特定の酵素の構造遺伝子あるいは遺伝子発現調節部位をターゲット部位とし、これを改変する場合、まず、公知の遺伝子クローニング法により、当該ターゲット部位のDNA領域をクローニングする。ついで、得られたターゲット部位の塩基配列において、1または複数の塩基に、置換、欠失、挿入または付加の変異を導入する。変異の導入は、オリゴDNAとポリメラーゼを用いる方法、制限酵素を用いる方法、PCRを用いる方法等により実施することができる。これらの一般的な方法は、例えばSambrookら,Molecular Cloning, Laboratory Manual, Second ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載されており、本発明の実施において利用可能である。

【0045】本発明における「相同組み換え体セレクションマーカー」とは、ターゲティングベクターが、相同組み換えの原理により宿主細胞に導入されたか否かを確認するためのマーカーである。該マーカーとしては、ポジティブネガティブセレクションを可能とするマーカー、すなわちポジティブセレクションマーカーおよびネ

ガティブセレクションマーカーからなるものであることが好ましい。ポジティブ-ネガティブセレクション法は、所望の相同組換え体のスクリーニングを容易にするための方法であって、相同組み換え体を選択し、かつ非相同組み換え体を除去することができる。

【0046】この方法では、まず、ポジティブセレクションマーカーの働きにより、形質転換された細胞のみが選択される。次に、ネガティブセレクションマーカーの働きにより相同組み換え体のみが選択される。ポジティブセレクションマーカーは形質転換体を選択するためのマーカーであり、例えば薬剤耐性遺伝子、栄養要求性相補遺伝子等が好適に使用できる。薬剤耐性遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子、オリゴマイシン耐性遺伝子、等が挙げられる。栄養要求性相補遺伝子としては、例えば、argB遺伝子 (Molecular cloning and deletion of the gene encoding AspergillopepsinA from *Aspergillus awamori*. Berka RM et. al. Gene, 1990 Feb.14, 86(2)p.153-162) 、pyrG遺伝子 (Recombinational Inactivation of the Gene Encoding Nitrate Reductase in *Aspergillus parasiticus*. Tzong-Shoon Wu et. al. Appl. Environ. Microbiol., Sept.1993, p.2998-3002) 、niaD遺伝子 (The development of a homologous transformation system for *Aspergillus oryzae* based on the nitrate assimilation pathway:a convenient and general selection system for filamentous fungal transformation. Sheila E. Unkles et. al. Mol. Gen. Genet. 1989, 218 p.99-104) 等が挙げられる。

【0047】ネガティブセレクションマーカーは形質転換体から非相同組み換え体を除去するためのマーカーであり、薬剤感受性遺伝子等が好適に使用できる。ネガティブセレクションマーカーは、相同組み換えが起こった時には染色体に組み込まれず、非相同組み換えが起こった時には染色体に組み込まれて機能することにより形質転換体の生育を阻害するものが好ましい。薬剤感受性遺伝子としては、例えばolc31遺伝子等が挙げられる (Transformation of *Aspergillus nidulans* with a cloned, \*

\* oligomycin-resistant ATP synthase subunit 9 gene. Michael Ward et. al. Mol. Gen. Genet. 1986, 202 p.265-270)。olc31遺伝子が非相同組み換えにより染色体に組み込まれた場合、細胞がトリエチルチルに対して感受性となるので、形質転換体はトリエチルチルを含む培地では生育できない。

【0048】本発明における「コピー数コントロール用マーカー」とは、細胞中に複数コピー存在するターゲット部位のうち、改変されている割合を確認するためのマーカーである。該マーカーとしては、改変されたターゲット部位のコピー数に応じて、マーカーの発現が定量的に観察できるものが使用される。本発明のコピー数コントロール用マーカーとしては、その発現が以下のいずれかの方法、すなわち細胞の薬剤感受性試験、薬剤耐性試験、細胞の生育速度、酵素活性試験、光学的方法または栄養要求性試験により観察できるようなポリペプチドをコードする遺伝子であることが好ましい。特に好ましいマーカーとしては、プレートアッセイ等の光学的方法による観察が可能である酵素、例えば発色性酵素 (ラッカーゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ等)、発光性酵素 (アルカリリフォスファターゼ、ホタルルシフェラーゼ等) が挙げられる。発色性酵素をマーカーに用いた場合には、シングルクロロニーアイソレーション時のプレート上で検定が可能であり目的の細胞を簡便に選択することができる。

【0049】ターゲティングベクターに含まれる3種のDNA構造 (a.改変されたターゲット部位、b.相同組み換え体セレクションマーカー、c.コピー数コントロール用マーカー) は、相同組み換えの原理によるターゲット部位の改変という目的を果たす限り、どのような順序で配置されていてもよい。本発明のターゲティングベクターとしては、以下(1)～(3)のいずれかの配置からなるDNA構造を含むものが好適に使用される：

(1)

【0050】

【化7】

ターゲット部位	コピー数コントロール用マーカー	ポジティブセレクションマーカー	ターゲット部位	ネガティブセレクションマーカー
—	—	—	—	—

(2)

【0051】

※【化8】

※

ターゲット部位	ポジティブセレクションマーカー	コピー数コントロール用マーカー	ターゲット部位	ネガティブセレクションマーカー
—	—	—	—	—

(3)

【0052】

【化9】

ターゲット部位	ポジティブセレクションマークー ーを兼ねるコピー数コントロール用マークー ー	ターゲット部位	ネガティブセレクションマークー ー
---------	--	---------	----------------------

【0053】上記(1)および(2)では、ターゲット部位内部へのコピー数コントロール用マークーおよびポジティブセレクションマークーの挿入によって、ターゲット部位が改変されている。上記(1)または(2)のターゲティングベクターが相同組み換えの原理により多核細胞に導入された場合は、改変されたターゲット部位、ポジティブセレクションマークー、およびコピー数コントロール用マークーが染色体に挿入される。このとき、ポジティブセレクションマークーを指標として選抜された組み換え体は相同組み換え体である。一方、上記(1)または(2)のターゲティングベクターが非相同組み換えの原理により多核細胞に導入された場合は、ネガティブセレクションマークーも染色体に挿入される。例えば、形質転換体を選択する培地に、ネガティブセレクションマークーとして用いた薬剤感受性遺伝子の導入により感受性になる薬剤を加えておくことにより、非相同組み換え体を生育させず、相同組み換え体のみを選択的に選抜することができる。

【0054】多核細胞における遺伝子ターゲティングが\*

ターゲット部位	タンナーゼプロモーター	ラッカーゼ*	タンナーゼターミネーター	pyrG	ターゲット部位	oliC31
---------	-------------	--------	--------------	------	---------	--------

【0057】(ここで、pyrGはオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子、oliC31はオリゴマインシン耐性ATPシンターゼサブユニット9遺伝子を示す。)なお、本発明のターゲティングベクターの形状は直鎖状であってもよく、また環状であってもよい。

【0058】2. 本発明のターゲット部位を改変する方法

本発明の方法は、多核細胞において、所望のコピー数のターゲット部位を改変する方法であって、以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とする方法である：

(1) 以下のa～cのDNA構造を宿主細胞に導入する工程

- a.改変されたターゲット部位、
- b.相同組み換え体セレクションマークー、
- c.コピー数コントロール用マークー；

(2) 相同組み換え体セレクションマークーの発現を指標として、相同組み換え体を選抜し、1コピー以上のターゲット部位が改変されている細胞を得る工程；

(3) 得られた相同組み換え体について、コピー数コントロール用マークーの発現を指標として選抜を行ない、所望のコピー数のターゲット部位が改変されている細胞を得る工程。

【0059】上記(1)の工程は、相同組み換えの原理

\* 可能である限り、ポジティブセレクションマークーとコピー数コントロール用マークーはそれぞれの機能を兼ね備えていれば、同一のマークーであってもよい。その場合、ターゲティングベクターは上記(3)に示した構成となる。

10 【0055】ターゲティングベクターについては、各構成部分は、直接隣り合っていてもよいし、あるいは適当な鎖長の塩基配列を介して連結されていてもよい。また、各構成部分の間には、マークー遺伝子やターゲット部位の発現に関与する塩基配列(プロモーター、エンハンサー等)あるいはその他任意の配列が挿入されていてもよい。さらに、本発明のターゲティングベクターに必須である3種のDNA構造の両側には、必要により遺伝子操作のために必要な他の塩基配列が連結されていてもよい。宿主細胞が糸状菌である場合の、本発明のターゲティングベクターの例を以下に示す：

【0056】

【化10】

によって多核細胞のターゲット部位を改変するために必要な、3種のDNA構造(a～c)を宿主に導入する工程である。この工程を効率的に実施するためには、上述した本発明のターゲティングベクターを、環状または直鎖状にて宿主細胞に導入する方法を採用することが好ましい。ベクターを宿主細胞に導入する場合は、公知の遺伝子導入法、例えば、エレクトロポレーション法、パーティクルガン(particle gun)を使用する方法、塩化カルシウムや塩化リチウムで処理した細胞をベクターと接触させる方法等を採用できる。

【0060】また、細胞を細胞壁分解酵素で処理してプロトプラストとした後にベクターと接触させる方法も好適である。

効率的にベクターを導入するため、プロトプラストとベクターとの接触は、ポリエチレングリコール存在下で行なうことが好ましい。細胞壁分解酵素としては、例えば、リゾチーム、セルラーゼ、キチナーゼ、あるいはこれらの混合物が使用できる。

【0061】あるいは、各DNA構造を多核細胞に別々に導入することもできる。例えば、相同組み換え体セレクションマークーのうちのポジティブセレクションマークーを含むベクターとその他のDNA構造を含むベクターを個別に調製し、共形質転換(co-transformation)法を用いて細胞内に導入することができる。

【0062】上記(2)の工程では、相同組み換え体セレクションマーカーの発現を指標として、相同組み換え体を選抜し、1コピー以上のターゲット部位が改変されている細胞を得ることができる。多核細胞のターゲット部位は複数個存在するから、(1)の工程で得られる相同組み換え体において、改変されたターゲット部位のコピー数は1コピー～全コピーとなる。

【0063】本発明の方法においては、相同組み換え体セレクションマーカーは、ポジティブセレクションマーカーおよびネガティブセレクションマーカーからなるマーカーであることが望ましい。そのようなマーカーを使用することにより、相同組み換え体を効率的に選抜することができる。上記(3)の工程では、得られた相同組み換え体について、コピー数コントロール用マーカーの発現を指標として選抜を行ない、所望のコピー数のターゲット部位が改変されている細胞を得ることができる。

【0064】コピー数コントロール用マーカーは、改変されたターゲット部位のコピー数に応じて、マーカーの発現が定量的に観察できるものである。例えば、コピー数コントロール用マーカーが発色性酵素(例えばラッカーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ等)の遺伝子である場合、マーカーの発現は以下のように観察する。まず、発色のための基質を添加した培地に、上記(2)の工程で得られた相同組み換え体を接種する。細胞が増殖してコロニーが形成されるので、該コロニーの発色またはコロニー周辺の培地の発色を観察する。細胞中に導入された発色性酵素のコピー数が多い程(すなわち改変されたターゲット部位のコピー数が多い程)、観察される発色は強くなる。

【0065】上記(2)の工程で得られる相同組み換え体において、改変されたターゲット部位のコピー数は様々である。予め、マーカーの発現量と、改変されたターゲット部位のコピー数との相関を把握しておけば、上記(3)の工程における選抜を繰り返すことにより、所望のコピー数のターゲット部位が改変されている細胞を得ることができる。

【0066】本発明の方法は、特に、ターゲット部位の全てを改変する方法として有用である。ターゲット部位の全てを改変する場合は、上記(3)の工程を下記のごとく実施すればよい：

- 得られた相同組み換え体を培地に播種する。
- コピー数コントロール用マーカーの発現が最も強い細胞を選抜する。
- 選抜された細胞を、培地に播種する。
- 1つの細胞から得られる子孫の細胞の全てが、等しい強度でコピー数コントロール用マーカーを発現するようになるまで、a～cの操作を繰り返す。

【0067】相同組み換え体における改変されたターゲット部位のコピー数は様々であるから、コピー数コントロール用マーカーが発色性酵素の遺伝子である場合、各

相同組み換え体のコロニーにおいて観察される発色の強度も様々である。発色が最も強く観察される細胞の選抜を続けると、最終的には全てのターゲット部位が改変された相同組み換え体を得ることができる。

【0068】本発明では、(4)の工程として、宿主細胞に導入したターゲティングベクター由来のDNA領域を除去する工程を加えてもよい。除去するDNA領域としては、マーカー遺伝子、遺伝子発現調節領域、ターゲット部位の一部等が挙げられる。特にマーカー遺伝子を除去することにより、同じマーカー遺伝子を再度利用して、他のターゲット部位の改変を行なうことが可能となる。

【0069】DNA領域を除去する場合は、相同組み換えの原理を利用した通常のターゲティングベクターを使用することができる。マーカー遺伝子を除去する場合のベクターとしては、以下のDNA構造、(1)マーカーが除去された後の染色体DNA領域および(2)ネガティブセレクションマーカーを有するものが例示される。そのようなベクターが相同組み換えの原理により宿主細胞に導入された場合、「宿主細胞の染色体DNA上のマーカー近傍の領域」と「マーカーが除去された後の染色体DNA領域」とが入れ替わるので、結果的に宿主細胞からマーカー遺伝子が除去される。一方、非相同組み換えが起きた宿主細胞は、ネガティブセレクションマーカーの働きにより排除することができる。実施例5に、本発明のターゲティングベクターを用いて作出したアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊株から、ターゲティングベクター由来のマーカー遺伝子を除去する方法について記載した。

30 【0070】3. 本発明により提供される多核細胞  
本発明は、上記のターゲティングベクターを宿主細胞に導入することにより、ターゲット部位の1コピー～全コピー、好ましくは全コピー、のターゲット部位が改変されていることを特徴とする多核細胞を提供する。また、本発明は上記の方法によりターゲット部位の1コピー～全コピー、好ましくは全コピー、のターゲット部位が改変されていることを特徴とする多核細胞も提供する。

【0071】本発明の多核細胞としては、以下のようものが例示される。

40 ·糸状菌由来であって、アルカリプロテアーゼ遺伝子の全コピーが破壊されている多核細胞。具体的には、実施例2に記載の1764-6-5株が挙げられる。1764-6-5株は、A. オリゼ由来であって、アルカリプロテアーゼ遺伝子の全コピーが破壊されている。

【0072】·マイコトキシンの生合成に関与する一つあるいは複数の酵素の遺伝子の全コピーが破壊されているマイコトキシン非生産細胞であって、A. ソーヤまたはA. オリゼ由来の多核細胞。マイコトキシンとしては、オクラトキシン、アフラトキシン等が挙げられる。

50 また、マイコトキシンの生合成に関与する遺伝子として

は、ver1, nor1, afrR, pksA 遺伝子；等が挙げられる。具体的には、実施例3に記載の、*Aspergillus Oryzae* 1764-22-5株 (FERM BP-6821; 平成11年8月3日付けて工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1-1-3) に寄託) が挙げられる。1764-22-5株は、A・オリゼ由来であって、pksA 遺伝子の全コピーが破壊されている。このため、アフラトキシン非生産性がより確実なものとなっている。

【0073】・同様に実施例4に記載の、*Aspergillus sojae* KS1-7-5株 (FERM BP-6820; 平成11年8月3日付けて工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託) が挙げられる。KS1-7-5株は、A・ソーヤ由来であって、pksA 遺伝子の全コピーが破壊されている。このため、アフラトキシン非生産性がより確実なものとなっている。

【0074】以下に、糸状菌由来の多核細胞を宿主とし、そのターゲット部位を改変する方法について説明する。糸状菌としては、細胞に複数の核を有する糸状菌であれば、特に限定されず、例えば、N・クラッサ、A・オリゼ、A・ソーヤを好適な生物として挙げができる。ターゲティング部位としては、改変が求められるいずれのDNA領域でも可能であり、特に、従来の技術では困難であった、その遺伝子の発現の観察が困難あるいは発現していない遺伝子領域においても可能である。本発明の所望のコピー数のターゲット部位が改変されている糸状菌は、例えば、以下のようなステップを経て作出される。

【0075】(1)まず、ポジティブセレクション可能な宿主の育種をおこなう。ただし、ポジティブセレクションマーカーとして用いる遺伝子の持つ機能と同様の機能をもつ遺伝子を、宿主細胞が有しない場合は宿主の育種は省略できる。

(2)改変が求められるターゲット部位をクローニングする。

(3)クローニングしたターゲット部位の1または複数の塩基に、置換、欠失、挿入または付加の変異を導入し、改変されたターゲット部位を作成する。

【0076】(4)改変されたターゲット部位、相同組み換え体セレクションマーカー (ポジティブセレクションマーカーおよびネガティブセレクションマーカーからなる)、コピー数コントロール用マーカーを含むターゲティングベクターを構築する。

(5)ターゲティングベクターを宿主に導入し、ポジティブセレクションマーカーにより形質転換体の選択を行うとともに、ネガティブセレクションマーカーにより相同組み換えのみが起こった形質転換体を選択する。

(6)相同組み換えのみが起こった形質転換体について、コピー数コントロール用マーカーの発現を指標として選抜を行い、所望のコピー数のターゲット部位が改変されている細胞を得る。

【0077】以下、糸状菌としてA・オリゼ、ターゲッ

ト部位としてアルカリプロテアーゼ遺伝子あるいはpksA 遺伝子、コピー数コントロール用マーカーとしてラッカーゼ遺伝子、相同組み換え体セレクションマーカーとしてpyrG遺伝子およびolc31遺伝子を用いた場合について各ステップごとに説明する。なお、同様の方法によりA・オリゼの任意のターゲット部位、あるいはA・オリゼの近縁の種であるA・ソーヤの任意のターゲット部位を改変することが可能である。

【0078】まず、第一のステップでは、pyrG遺伝子領域での相同組み換えを防ぐため、A・オリゼのpyrG遺伝子欠失株を作出して宿主とする。まず、ポジティブセレクションマーカーとして用いるpyrG遺伝子プロモーター上游の領域と構造遺伝子領域下流のDNA断片をPCR法で増幅、結合し、pyrG遺伝子領域の欠失したpyrG遺伝子近傍のDNA断片を作製する。

【0079】次いで、pyrG遺伝子領域の欠失したpyrG遺伝子近傍のDNA断片と、niaD遺伝子を含むプラスミドを用いてA・オリゼのniaD株の形質転換を行うことにより、pyrG遺伝子欠失株が得られる。なお、上記niaD株は、KClO<sub>3</sub>耐性を指標として選択することができる。

【0080】pyrG遺伝子欠失株は、pyrG遺伝子にコードされているorotidine-5'-phosphatedecarboxylaseが機能しないので、5-Fluoroorotic acidを含む最小培地で生育可能である。また、pyrG遺伝子欠失株はウリジン要求性を示すので、培地にはウリジンを加える必要がある。

【0081】第二のステップでは、改変が求められるターゲット部位をクローニングする。アルカリプロテアーゼ遺伝子のクローニングは、すでにクローニングされていたアスペルギルス・オリゼ由来のアルカリプロテアーゼ遺伝子断片をプローブにして行った。プローブと結合しサザン解析で濃いバンドを示すアスペルギルス・ソヤアルカリプロテアーゼ遺伝子断片を含むDNA断片をベクターと結合し、大腸菌を形質転換後、コロニーハイブリダイゼーション法により目的のアルカリプロテアーゼ遺伝子を取得する。pksA遺伝子は、すでに知られているpksA遺伝子 (GeneBank accession number: Z47198) の配列をもとにPCR法により取得できる。

【0082】第三、第四のステップでは、クローニングしたターゲット部位にポジティブセレクションマーカーおよびコピー数コントロール用マーカーを挿入あるいは置換することにより改変し、改変されたターゲット部位、相同組み換え体セレクションマーカー、コピー数コントロール用マーカーを含むターゲティングベクターを構築する。ポジティブセレクションマーカーとして用いたpyrG遺伝子は既知の配列 (Gene Bank accession number: Y13811) をもとにPCR法で取得できる。ネガティブセレクションマーカーとして用いたolc31遺伝子はMichael Wardら (Mol Gen Genet (1986) 202:265-270) 記載のプラスミドから取得できる。コピー数コントロール用

マーカーとしては、*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (1), 58-64, 1999に記載のプラスミド（タンナーゼ遺伝子プロモーター、ターミネーターとラッカーゼ構造遺伝子をコピー数コントロール用マーカーとして含むプラスミド）から取得できる。ベクターの構築は図4と図5に示した。まず、pUC18ベクターにネガティブセレクションマーカーとターゲット部位を結合する。次に、PCR法を用いてポジティブセレクションマーカーとコピー数コントロール用マーカーをpUC18ベクターに結合し、さらに、それを鋳型にPCR法で増幅した、ポジティブセレクションマーカーとコピー数コントロール用マーカーを含むDNA断片をネガティブセレクションマーカーとターゲット部位を含むプラスミドに結合して、ターゲティングベクターを構築する。

【0083】第五のステップではターゲティングベクターを宿主に導入し、ポジティブセレクションマーカーにより形質転換体の選択を行うとともに、ネガティブセレクションマーカーにより相同組み換えが起こった形質転換体を選択する。宿主として用いるPyrG遺伝子欠失株を細胞壁溶解酵素（例えは商品名「ノボザイム234」（ノボ社））で処理し、プロトプラストを調製する。

【0084】得られたプロトプラストにターゲティングベクターを加え、ポジティブセレクションマーカーであるpyrG遺伝子が導入された形質転換体のみが生育可能なポジティブセレクションプレート（ウリジンを含まない最小培地）を用いて形質転換体の選抜を行う。得られた形質転換体をウリジンを含むGA培地とウリジンを含むトリエチルチニン培地に点植後、両培地に生育し、GA培地で褐変が見られる形質転換体を選抜する。培地にウリジンを含む培地を使用することにより、改変されたターゲット部位のコピー数が少ない形質転換体の生育が促進される。

【0085】非相同組み換えが起こった形質転換体は、ネガティブセレクションマーカーである $\alpha$ lIC31遺伝子の働きでトリエチルチニンプレートでは生育しないため、相同組み換えのみが起こった形質転換体が選択される。また、コピー数コントロール用マーカーであるラッカーゼ遺伝子の導入された形質転換体はラッカーゼの働きによりGAが酸化されGAプレートで褐変がみられる。

【0086】第六のステップでは相同組み換えのみが起こった形質転換体について、コピー数コントロール用マーカーの発現を指標として選抜を行い、所望のコピー数のターゲット部位が改変されている細胞を得る。相同組み換えのみが起こった形質転換体の胞子をウリジンを含むGAプレートに播種し、30°Cで4日間培養する。得られる各コロニーの中から、より強く褐変がみられる株の胞子を取り、再度ウリジンを含むGAプレートに播種する。得られるすべてのコロニーで同程度に強く褐変が見られるまで上記播種をくり返す。このようにして得られた株は、すべての核で所望のターゲット部位が改変され

た株である。また、播種により得られた中程度の褐変を示すコロニーは、細胞内に、所望のターゲット部位が改変された核とベクターが挿入されていない核が混在する株であり、より褐変が進んだ株を選択することにより、細胞内の所望のターゲット部位が改変された核の割合が高い株を、褐変の程度が低い株を選択することにより、細胞内の所望のターゲット部位が改変された核の割合が低い株を選択することができる。

【0087】

10 10 【実施例】以下、実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

コピー数コントロール用マーカーを含むベクターを用いたアルカリプロテアーゼ遺伝子の破壊

実施例1では、ラッカーゼをコピー数コントロール用マーカーとする、アルカリプロテアーゼ遺伝子破壊用ベクターを構築し、A・オリゼに導入した。該マーカーの発現を指標にして、細胞内に異なる核を有する様々な形質転換体が得られる事を確認した。

20 20 【0088】(1) アルカリプロテアーゼ遺伝子破壊用ベクターの構築

アルカリプロテアーゼ遺伝子破壊用ベクターの構築を図1を用いて以下に説明する。pUC19C結合した、A・オリゼタンナーゼ遺伝子プロモーターおよびシグナルシーケンスの下流にスエヒロタケラッカーゼ遺伝子成熟領域、さらにその下流にタンナーゼ遺伝子ターミネーターを結合したプラスミド $\lambda$ acAL/pTPT (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (1), 58-64, 1999記載のプラスミド)を鋳型にプライマー1 (5'GAA TTC TAG ATC TCG GG A GCC GGG TAT 3'; 配列番号1) およびプライマー2 (5'CGG GGT TTT TAG ATC TTT CAT GCG GG 3'; 配列番号2)を用いてPCRを行った (94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 3分30サイクル、72°C 2分 1サイクル)。得られたPCR断片をBglIIで処理した後、QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.) を用いてPCR断片の精製を行った。

【0089】A・ソーヤ アルカリプロテアーゼ遺伝子 (Gene Bank Accession Number : E03647) N末端部分を含むBamHI-EcoRI断片をpuc118BamHI-EcoRI部位に結合し、プラスミドpUC118pEBとした。プラスミドpUC118pEBのEcoRI部位にアルカリプロテアーゼ遺伝子C末端部分を含むEcoRI断片を結合しプラスミドpEEB65とした。pEEB65をSacIで処理後、平滑末端化処理し、BamHIリンカーを結合しプラスミドpA1pEBBとした。pA1pEBBのアルカリプロテアーゼ構造遺伝子内のBglII部位に上記DNA断片を結合しプラスミドp1acEEB7とした。

【0090】(2) アルカリプロテアーゼ遺伝子破壊株の作出

アルカリプロテアーゼ遺伝子破壊用宿主として用いる為、特開平8-80196号公報記載の方法を用い、A・オリ

セ1764株 (IAM2636) のniaD遺伝子欠損株 (nitrateductase欠損株) の作出を行った。得られた株を、A・オリゼ1764 niaD株と命名した。

【0091】*placEEB7*を錆型に、プライマー3 (5'ATG CAG TCC ATC AAG CGT ACC TTG 3'; 配列番号3) およびプライマー4 (5'CGG CGT CGC CAG CAA TGT TCG 3'; 配列番号4) を用いてPCRを行い (94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 6分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル) 、PCR断片を得た。得られたPCR断片と、niaD遺伝子を含むプラスミドpSTA14(Mol.Gen.Genet (1989) 218:p.99-104)を用い、特開平8-80196号公報記載の方法により、1764 niaD株の形質転換を行った。形質転換体500株を、没食子酸 (GA)プレート (1.2% diammonium dihydrogen phosphate, 0.2% potassium dihydrogen phosphate, 0.1% magnesium sulfate, 5.3% glucose, 1% gallic acid, 0.005% copper(I)sulfate pentahydrate; pH6.0) に点植し、ラッカーゼの働きにより褐変が見られる約150株の形質転換体を得た。

【0092】(3) 形質転換体の解析

GAプレートで褐変が見られた150株の形質転換体の染色体DNAを、特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得した。得られた染色体DNAをPvuII処理後、ラッカーゼ遺伝子の成熟領域をプローブとしてサザン解析を行い、ベクターに含まれるラッカーゼ遺伝子由来のバンドが検出された形質転換体4株 (1764-36株、1764-66株、1764-82株、1764-135株)を得た。1764-66株はラッカーゼ遺伝子由来のバンドの数が最も少なかったので、染色体に挿入されたアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊用ベクターのコピー数が最も少ない株であると判断した。

【0093】1764-66株について、GAプレート上でシングルコロニーアイソレーションを行い、全く褐変が見られないものから、濃く褐変するものまで多段階の褐変度合いを示す14株を得た。得られた14株の染色体DNAを特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得後、PvuIIで処理し、タンナーゼ遺伝子ターミネーター領域およびアルカリプロテアーゼ遺伝子プロモーター領域をプローブにサザン解析を行った。

【0094】サザン解析の結果、1764-66株は、以下の3種類の核 (核A~C) が混在する株であることを確認した。

核A：目的のA1p遺伝子部位およびそれとは異なる部位にアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊用ベクターが挿入された核、すなわち、1つの核に2コピーのベクターが挿入されている核。

【0095】核B：目的のA1p遺伝子部位とは異なる部位にアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊用ベクターが挿入された核、すなわち、1つの核に1コピーのベクターが挿入されている核。

核C：アルカリプロテアーゼ遺伝子破壊用ベクターが挿入されていない核。

【0096】(4) 異なる核を持つ形質転換体の選択 1764-66株からシングルコロニーアイソレーションされた上記14株のサザン解析を行い、それぞれの株の核の状態を確認した (図2)。サザン解析に用いた株の染色体DNAは、特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得し、PvuIIで処理後、タンナーゼ遺伝子ターミネーター領域およびアルカリプロテアーゼ遺伝子プロモーター領域をプローブにサザン解析を行った。

【0097】a) 上記14株の内、もっとも濃く褐変している株を選び、GAプレート上でシングルコロニーアイソレーションを行った。さらに、得られた株の内もっとも濃く褐変している株を選びシングルコロニーアイソレーションを行ったところ、全ての单胞子由来の株が濃く褐変する株が得られた [この株では、全ての核が核Aである (図2 (A) のレーン1,5,9,14)。レーン1,5,9,14ではアルカリプロテアーゼ遺伝子をプローブにした場合は、宿主 (1764niaD株) に見られるバンドが消失し、アルカリプロテアーゼ遺伝子の位置で組み換えが起こったと予想される位置に新たなバンドが見られた。また、タンナーゼ遺伝子をプローブに用いた場合、宿主に見られるバンドに加え、アルカリプロテアーゼ遺伝子の位置で組み換えが起こったと予想される位置、さらにはそれ以外に非特異的に組み換えが起こった結果生じたと考えられる合計3本のバンドが見られた。]。また、ほとんどの单胞子由来の株が濃く褐変するが、やや薄めの株が存在する株が得られた (この株は、ほとんどの核が、核Aで占められているが、わずかに核Bが混在している)。

【0098】b) 同様に、上記14株の内、やや薄めに褐変する株を選びシングルコロニーアイソレーションをくり返すと、单胞子由来の株が1764-66と同様に多段階の褐変度合いを示す株が得られた [この株では、核A、核B、核Cが混在する (図2 (A) のレーン3,4)。レーン3,4ではアルカリプロテアーゼ遺伝子をプローブにした場合、宿主に見られるバンドおよびアルカリプロテアーゼ遺伝子の位置で組み換えが起こったと予想される位置に新たなバンドが見られた。また、タンナーゼ遺伝子をプローブに用いた場合、宿主に見られるバンドに加え、アルカリプロテアーゼ遺伝子の位置で組み換えが起こったと予想される位置、さらにはそれ以外にすべての核が核Aで占められた株およびすべての核が核Bで占められた株でみられる、非特異的に組み換えが起こった結果生じたと考えられる合計4本のバンドが見られた。]。また、全ての单胞子由来の株が同様にやや薄めに褐変する株が得られた [この株では、全ての核が核Bである (図2 (B) のレーン2,6,7,10,11,12,13)。レーン2,6,7,10,11,12,13ではアルカリプロテアーゼ遺伝子をプローブにした場合、宿主と同じ位置に1本のバンドが見られた。タンナーゼ遺伝子をプローブに用いた場合、宿主に見られるバンドに加え、非特異的に組み換えが起こった結果生じたと考えられる合計2本のバンドが見られた

(すべての核が核Aで占められた株で見られる非特異的組み換えによるバンドの位置とは異なることから、核Aとは異なる位置で非特異的組み換えが起こったと考えられる)。】。

【0099】c) 同様に14株の内、褐変の程度が最も薄い株を選びシングルコロニーアイソレーションをくり返すと、すべての単胞子由来の株について、褐変の見られない株が得られた【この株では、全ての核が核Cである(図2(A)、(B)のレーン8)。レーン8では、アルカリプロテアーゼ遺伝子およびタンナーゼ遺伝子のどちらのプローブを用いた場合にも宿主と同じ位置にバンドが見られた。】。シングルコロニーアイソレーションを行なった際に、多段階の褐変度合いを示す株の場合でも、その株の褐変の程度により、核Aがより多く存在する株あるいは核B、核Cが多く存在する株を選択することができる事が示された。

【0100】このように、コピー数コントロール用マーカーの発現(GAプレート上での褐変の程度)を指標にして、様々な核の状態を持つ形質転換体を選択できることが示された。図3にレーン1から14で示した株をGAプレートに点植した結果を示す。それぞれの株は、細胞内のラッカーゼ遺伝子のコピー数を反映した褐変の程度を示している。

#### 【0101】実施例2

##### 本発明のターゲティングベクターを用いたA.オリゼアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊株の作出

実施例2では、本発明のターゲティングベクターを構築し、A・オリゼのアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊株を得た。該ベクターは、改変されたアルカリプロテアーゼ遺伝子、コピー数コントロール用マーカーとしてのラッカーゼ遺伝子、ポジティブセレクションマーカーとしてのpyrG遺伝子、ネガティブセレクションマーカーとしてolIC31遺伝子、コピー数コントロール用マーカーとしてラッカーゼ遺伝子、ラッカーゼ遺伝子の発現に必要な領域としてタンナーゼ遺伝子プロモーターおよびターミネーターが含まれている。アルカリプロテアーゼ遺伝子は、pyrG遺伝子ラッカーゼ遺伝子・タンナーゼ遺伝子プロモーターおよびターミネーターの挿入により破壊されている。

#### 【0102】(1) アルカリプロテアーゼ遺伝子破壊用ターゲティングベクターの構築

アルカリプロテアーゼ遺伝子破壊用ターゲティングベクターの構築を図4を用いて以下に説明する。特開平8-196号公報記載の方法を用いて取得したA・オリゼ A01株の染色体DNAを鋳型に、プライマー5(5' CAG ACT GA C TCT GTG GATCCG 3'; 配列番号5)およびプライマー6(5' CGG ATA CCC AGA TCT TGT GGC3'; 配列番号6)を用いてPCRを行い、pyrG遺伝子を含むDNA断片を得た(94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 3分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル)。得られたPCR断片をBglIIとBamHIで処理した後、QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.)を用いてPCR断片の精製を行った。

【0103】pUC18をBamHIで処理、脱リン酸化後、上記PCR断片と結合してプラスミドppyrG-26とした。lacZ/pTPTを鋳型に、プライマー1(配列番号1)およびプラ

イマー2(配列番号2)を用いてPCRを行い(94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 3分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル)、得られたPCR断片をBglIIで処理した後、QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.)を用いてPCR断片の精製を行った。

【0104】ppyrG-26をBamHIで処理、脱リン酸化後、上記PCR断片と結合してプラスミドpTLTpyrG-1とした。A・ニードランス OliC31 PstI-XbaI断片をpUC18 PstI-SalI部位に結合しプラスミドpMWPX-2とした。pMWPX-2をBamHIで処理、脱リン酸化後、アルカリプロテアーゼ遺伝子を含むpAlpBEB BamHI断片を結合しプラスミドp01iAlp-1とした。

【0105】pTLTpyrG-1を鋳型にプライマー7(5' CGT TGC CCA CAT CTG TAA ACG 3'; 配列番号7)およびプライマー8(5' CAC CCA TAG ATC TGG TCG GAC 3'; 配列番号8)を用いてPCRを行い(94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 5分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル)、得られたPCR断片をBglIIで処理した後、QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.)を用いてPCR断片の精製を行った。

【0106】p01iAlp-1をBglIIで処理、脱リン酸化後、上記PCR断片を結合して、本発明のターゲティングベクター構造を含むプラスミドpAlp-8とした。pAlp-8には、改変されたターゲット部位としてアルカリプロテアーゼ遺伝子、ポジティブセレクションマーカーとしてpyrG遺伝子、ネガティブセレクションマーカーとしてolIC31遺伝子、コピー数コントロール用マーカーとしてラッカーゼ遺伝子、ラッカーゼ遺伝子の発現に必要な領域としてタンナーゼ遺伝子プロモーターおよびターミネーターが含まれている。アルカリプロテアーゼ遺伝子は、pyrG遺伝子ラッカーゼ遺伝子・タンナーゼ遺伝子プロモーターおよびターミネーターの挿入により破壊されている。

【0107】(2) pyrG遺伝子欠失宿主株の作出  
以下の方法により、ターゲティングベクターを導入するための宿主株を作出した。まず、特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得した、A01株の染色体DNAを鋳型に、プライマー9(5' TAT CCA TAA GCT TTT GAA GAG 3'; 配列番号9)およびプライマー10(5' CTG GAG GCT TCC CCG CAT TAG TGA TG 3'; 配列番号10)を用いてPCRを行った(94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 3分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル)。得られたPCR断片をHindIIIとBssHIIで処理した後、QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.)を用いてPCR断片の精製を行った。

【0108】同様に、A01株の染色体DNAを鋳型に、プライマー11(5' GAC CTA CAG CGC CGC TAG CAA GC 3'; 配列番号11)およびプライマー12(5' TCT CAC T AG ATC TAT TCA TCC 3'; 配列番号12)を用いてPCRを行った(94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒

72°C 3分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル）。得られたPCR断片をBglIIとBssHIIで処理した後、QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.) を用いてPCR断片の精製を行った。

【0109】両PCR断片を、BamHIとHindIIIで処理したpUC18に加え、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて結合した後、それぞれの断片がpUC18に1コピーずつ結合したプラスミドを選択し、p<sub>pyr</sub>GdeIとした。p<sub>pyr</sub>GdeIを鋳型に、プライマー13 (5' TGT CTC AAA AGT CG GTC AAG AGT ATC C 3'; 配列番号13) およびプライマー14 (5' AGC CCA GAA AGC GAC ACG CCT ACC TT 3'; 配列番号14) を用いてPCRを行い (94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 6分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル) PCR断片を得た。

【0110】得られたPCR断片とpSTA14を用い、特開平8-80196号公報記載の方法により、1764 niaD 株の形質転換を行った。得られた形質転換体のうち、10mMウリジン、0.2%5-Fluoroorotic Acidを含む最小培地 (UFプレート: 3.5%CZAPEK-DOX BROTH DIFCO社製) で生育する株の染色体DNAを特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得し、XbaI処理後、pyrG構造遺伝子領域をプローブにサザン解析を行った。サザン解析の結果で、1764niaD 株より約750bp短いバンドが1本みられる1764-4株を選択し、pyrG遺伝子欠失宿主株とした。

【0111】(3) ターゲティングベクターを用いたアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊株の作出  
pdAlp-8を鋳型に、プライマー15 (5' CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC 3'; 配列番号15) およびプライマー16 (5' ACA CCT ATG ACC ATG ATT ACC 3'; 配列番号16) を用いてPCRを行い (94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 58°C 30秒 72°C 10分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル) 、PCR断片を得た。該PCR断片には、改変されたターゲット部位としてアルカリプロテアーゼ遺伝子、ポジティブセレクションマーカーとしてpyrG遺伝子、ネガティブセレクションマーカーとしてolc31遺伝子、コピー数コントロール用マーカーとしてラッカーゼ遺伝子、ラッカーゼ遺伝子の発現に必要な領域としてタンナーゼ遺伝子プロモーターおよびターミネーターが含まれている。

【0112】得られたPCR断片を用い、特開平8-80196号公報記載の方法により、1764-4株の形質転換を行った。具体的に、まず、宿主株の培養物を濾過して細胞を集めた後、細胞を細胞壁溶解酵素 (商品名「ノボザイム234」(ノボ社)) で処理してプロトプラストとした。次いで、該プロトプラストと上記PCR断片をポリエチレングリコール存在下で混合し、氷上で20分放置した。この操作によりPCR断片がプロトプラストに導入され、さらに相同組み換えの原理により、PCR断片中のネガティブセレクションマーカー以外のDNA構造が染色体上のターゲット部位に挿入される。氷上放置後に、

ソルビトールを含む最小培地でプロトプラストを培養し、細胞壁を再生させた。ついで、細胞を軟寒天培地に移し、コロニーが出現するまで培養した。なお、実施例3 (2)、実施例4 (2) および実施例5 (2) における形質転換も同様の方法で行なった。形質転換体120株を、10mMウリジンを含むGAプレート (UGプレート) および10mMウリジン、0.00002%トリエチルチタンを含む最小培地 (UTプレート: 3.5%CZAPEK-DOX BROTH DIFCO社製) に点植し、UTプレートで生育し、UGプレートで薄く褐変する形質転換体を選択した。選択した株をUGプレート上でシングルコロニーアイソレーションし、コピー数コントロール用マーカー (UGプレート上での褐変の程度) を指標にして、褐変の程度の最も濃い株を選択した。それぞれの単胞子由来の株が、一様に濃くなるまで数回シングルコロニーアイソレーションをくり返し、最終的に得られた株を1764-6-5株とした。

【0113】1764-6-5株の染色体DNAを特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得し、ApaLI処理後、アルカリプロテアーゼ遺伝子プロモーター領域をプローブにサザン解析を行った。その結果、親株である1764-4株では約1.6 kbと約3 kbのバンドが見られたのに対して、1764-6-5株では、約1.6 kbのバンドとアルカリプロテアーゼ遺伝子部位での相同組み換えにより染色体上にベクターが挿入された際に予想される、約8 kbのバンドが見られた。また、1764-6-5株をカゼインプレートに点植したところ、1764-6-5株はほとんどハローを示さなかった。細胞がアルカリプロテアーゼを発現する場合は、プレート中のカゼインが分解されてハローが観察される。ターゲティングベクターの導入により、1764-6-5株のアルカリプロテアーゼ遺伝子が破壊されたことが示唆された。

【0114】(4) PCRによるアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊株の確認

1764-6-5株の染色体DNAを鋳型に、プライマー17 (ベクターに用いたpyrG遺伝子内の配列: 5' GTA CCG GAG TG T CTG AAG GTG 3'; 配列番号17) およびプライマー18 (ベクターに用いたアルカリプロテアーゼ遺伝子よりさらに下流の配列: 5' CTA CCC CTT CGT GGC CAT ACC 3'; 配列番号18) を用いてPCRを行った (94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 58°C 30秒 72°C 3分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル)。ベクターがアルカリプロテアーゼ遺伝子部位で相同組み換えを起こした場合に増幅される約2.8 kbのバンドが観察された。

【0115】また、プライマー19 (アルカリプロテアーゼ翻訳開始点下流の配列: 5' ATCCAG TCC ATC AAG CGT ACC 3'; 配列番号19) およびプライマー18を用いてPCRを行った (94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 58°C 30秒 72°C 7分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル)。ベクターがアルカリプロテアーゼ遺伝子部位で相同組み換えを起こした場合に増幅される約7.5 kbのバンドが増幅された。以上により、1764-6-5株はアルカリプロ

ロテアーゼ遺伝子の位置で相同組み換えが起こった株であること、および本発明のターゲティングベクターの導入により、細胞中のアルカリプロテアーゼ遺伝子の全コピーが破壊されていることをPCRで確認した。本発明のターゲティングベクターおよび方法により、A・オリゼのアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊株(1764-6-5株)が作出された。

【0116】実施例3

本発明のターゲティングベクターを用いたA.オリゼ pksA遺伝子破壊株の作出

実施例3では、本発明のターゲティングベクターを構築し、A・オリゼのpksA遺伝子破壊株を得た。該ベクターは、改変されたpksA (polyketide synthase) 遺伝子、コピー数コントロール用マーカーとしてのラッカーゼ遺伝子、ポジティブセレクションマーカーとしてのpyrG遺伝子、ネガティブセレクションマーカーとしてのolIC31遺伝子を含む。

【0117】(1) pksA遺伝子破壊用ターゲティングベクターの構築

pksA遺伝子破壊用ターゲティングベクターの構築を図5を用いて以下に説明する。特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得した、A・ソーヤ A1株の染色体DNAを鋳型にプライマー20 (5' CAA TTT TCG CTA CCC TAT GT G 3'; 配列番号20) およびプライマー21 (5' CGC CCT TCG TCG CGA GAG CTC 3'; 配列番号21) を用いてPCRを行い (94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 58°C 30秒 72°C 10分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル)、pksA遺伝子を含む約8.5kbのPCR断片を得た。得られたPCR断片をNheIとNruIで処理した後、QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.) を用いてPCR断片の精製を行った。pMWXP-2をXbaIとSmaIで処理した後、上記PCR断片を結合しプラスミドpOIC-pksA-43とした。なお、pOIC-pksA-43の調製には、E.coli SCS110株 (STRATAGENE社製) を用いた。

【0118】pTLTpyrG-1を鋳型にプライマー7およびプライマー8を用いてPCRを行い (94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 5分 30サイクル、72°C 2分1サイクル)、得られたPCR断片をBglIIで処理した後、QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.) を用いてPCR断片の精製を行った。pOIC-pksA-43をFbaIとBglIIで処理、脱リン酸化後、上記PCR断片を結合し、本発明のターゲティングベクター構造を含むプラスミドpd pksA-38とした。

【0119】pd pksA-38には、改変されたターゲット部位としてpksA遺伝子、ポジティブセレクションマーカーとしてpyrG遺伝子、ネガティブセレクションマーカーとしてolIC31遺伝子、コピー数コントロール用マーカーとしてラッカーゼ遺伝子、ラッカーゼ遺伝子の発現に必要な領域としてタンナーゼ遺伝子プロモーターおよびターミネーターが含まれている。

【0120】pksA遺伝子は、pyrG遺伝子、ラッカーゼ遺伝子、タンナーゼ遺伝子プロモーターおよびターミネーターの挿入により破壊されている。pd pksA-38を用いて大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体をE.coli XL-1Blue(pd pksA-38)と命名した (FERM BP-6819; 平成11年8月3日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託)。

【0121】(2) ターゲティングベクターを用いたpksA遺伝子破壊株の作出

10 pd pksA-38を鋳型に、プライマー15およびプライマー16を用いてPCRを行い (94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 58°C 30秒 72°C 10分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル)、改変されたターゲット部位としてpksA遺伝子、ポジティブセレクションマーカーとしてpyrG遺伝子、ネガティブセレクションマーカーとしてolIC31遺伝子、コピー数コントロール用マーカーとしてラッカーゼ遺伝子、ラッカーゼ遺伝子の発現に必要な領域としてタンナーゼ遺伝子プロモーターおよびターミネーターを含むPCR断片を得た。

20 【0122】得られたPCR断片を用い、特開平8-80196号公報記載の方法を用いて、1764-4株の形質転換を行った。形質転換体200株をUGプレートおよびUTプレートに点植し、UTプレートで生育し、UGプレートで薄く褐変する形質転換体を選択した。選択した株をUGプレート上でシングルコロニーアイソレーションし、コピー数コントロール用マーカー (UGプレート上での褐変の程度) を指標にして、褐変の程度の最も濃い株を選択した。それぞれの単胞子由来の株が、一様に濃くなるまで数回シングルコロニーアイソレーションをくり返し、最終的に得られた株を1764-22-5株とした。

30 【0123】1764-22-5株の染色体DNAを特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得し、SalI処理後、pksA遺伝子領域をプローブにサザン解析を行った。その結果、親株である1764-4株では約4.8kbのバンドが見られたのに対して、1764-22-5株では、pksA遺伝子部位での相同組み換えにより染色体上にベクターが挿入された際に予想される、約8.5kbのバンドが見られた。

40 【0124】(3) PCRによるpksA遺伝子破壊株の確認 pksA遺伝子の破壊を確認するために、1764-22-5株の染色体DNAを鋳型にPCRを行った (94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 58°C 30秒 72°C 3分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル)。プライマー22 (5' CAC CCT CGG AAT AGT CCT CTC 3') およびプライマー-23 (5' TGG CGG GT T CGG TCG CAG GCA TTT GA 3') を用いた場合に、ベクターがpksA遺伝子部位で相同組み換えを起こした場合に増幅される約1.9kbのバンドが増幅された。

50 【0125】このように、1764-22-5株はpksA遺伝子の位置で相同組み換えが起こった株であること、および本発明のターゲティングベクターの導入により、細胞中のpksA遺伝子の全コピーが破壊されていることをPCRで確

認した。本発明のターゲティングベクターおよび方法により、A・オリゼのpksA遺伝子破壊株（1764-22-5株）が作出された。1764-22-5株を、*Aspergillus Oryzae* 17-64-22-5と命名した（FERM BP-6821；平成11年8月3日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託）。

【0126】実施例4

本発明のターゲティングベクターを用いたA.ソーヤ pksA遺伝子破壊株の作出

実施例4では、実施例3にて構築したターゲティングベクター（pd<sub>pksA</sub>を鋳型に増幅したPCR断片）をA・ソーヤに導入し、A・ソーヤpksA遺伝子破壊株を得た。

【0127】（1）A.ソーヤ pyrC遺伝子欠失宿主株の作出

特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得した、A01株の染色体DNAを鋳型に、プライマー9およびプライマー24（5' ATG CAC TAG CGG CCC GTT TCT CCC3'；配列番号24）を用いてPCRを行った（94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 3分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル）。得られたPCR断片をHindIIIとBssHIIで処理した後、QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.) を用いてPCR断片の精製を行った。

【0128】また、A01株の染色体DNAを鋳型に、プライマー25（5' GAA CGT GCA CGG CCCGAT TCG TCT 3'；配列番号25）およびプライマー12を用いてPCRを行った（94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 3分 30サイクル、72°C 2分1サイクル）。得られたPCR断片をBglIIとBssHIIで処理した後、QiAquick PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.) を用いてPCR断片の精製を行った。

【0129】両PCR断片を、BamHIとHindIIIで処理したpUC18に加え、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて結合した後、それぞれの断片がpUC18に1コピーずつ結合したプラスミドを選択しppyrGde1-2とした。ppyrGde1-2を鋳型に、プライマー13およびプライマー14を用いてPCRを行い（94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒55°C 30秒 72°C 6分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル）PCR断片を得た。得られたPCR断片とpSTA14を用いて、特開平8-80196号公報記載の方法により、A.ソーヤKS1 niaD株の形質転換を行った。

【0130】得られた形質転換体のうち、10mMウリジン、0.2%5-Fluoroorotic Acidを含む最小培地（UFプレート：3.5%ZAPEK-DOX BROTH DIFCO社製）で生育する株の染色体DNAを特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得し、XbaI処理後、pyrC構造遺伝子領域をプローブにサザン解析を行った。サザン解析の結果、KS1 niaD株より約1.4kb短いバンドが1本みられるKS1-7株を選択し、pyrC遺伝子欠失宿主株とした。

【0131】（2）ターゲティングベクターを用いたA.ソーヤ pksA遺伝子破壊株の作出

実施例3で構築したpd<sub>pksA</sub>-38を鋳型に、プライマー15

およびプライマー16を用いてPCRを行い（94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 58°C 30秒 72°C 10分30サイクル、72°C 2分 1サイクル）、改変されたターゲット部位としてpksA遺伝子、ポジティブセレクションマーカーとしてpyrC遺伝子、ネガティブセレクションマーカーとしてolIC31遺伝子、コピー数コントロール用マーカーとしてラッカーゼ遺伝子、ラッカーゼ遺伝子の発現に必要な領域としてタンナーゼ遺伝子プロモーターおよびタミネーターを含むPCR断片を得た。

10 【0132】得られたPCR断片を用い、特開平8-80196号公報記載の方法を用いて、KS1-7株の形質転換を行った。形質転換体220株をUGプレートおよびUTプレートに点植し、UTプレートで生育し、UGプレートで薄く褐変する形質転換体を選択した。選択した株をUGプレート上でシングルコロニーアイソレーションし、コピー数コントロール用マーカー（UGプレート上の褐変の程度）を指標にして、褐変の程度の最も濃い株を選択した。それぞれの単胞子由来の株が、一様に濃くなるまで数回シングルコロニーアイソレーションをくり返し、最終的に得られた株をKS1-7-5株とした。

20 【0133】KS1-7-5株の染色体DNAを特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得し、SalI処理後、pksA遺伝子領域をプローブにサザン解析を行った。その結果、親株であるKS1-7株では約4.8kbのバンドが見られたのに対して、KS1-7-5株では、pksA遺伝子部位での相同組み換えにより染色体上にベクターが挿入された際に予想される、約8.5kbのバンドが見られた。

【0134】（3）PCRによるpksA遺伝子破壊株の確認

pksA遺伝子の破壊を確認するために、KS1-7-5株の染色体DNAを鋳型にPCRを行った（94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 58°C 30秒 72°C 3分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル）。プライマー22および23を用いた場合に、ベクターがpksA遺伝子部位で相同組み換えを起こした場合に増幅される約1.9kbのバンドが増幅された。

【0135】このように、KS1-7-5株はpksA遺伝子の位置で相同組み換えが起こった株であること、および本発明のターゲティングベクターの導入により、細胞中のpksA遺伝子の全コピーが破壊されていることをPCRで確認した。すなわち、本発明のターゲティングベクターおよび方法により、A・ソーヤのpksA遺伝子破壊株（KS1-7-5株）が作出された。KS1-7-5株を、*Aspergillus sojae* KS1-7-5と命名した（FERM BP-6820；平成11年8月3日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託）。

【0136】実施例5

マーカー除去ベクターを用いたアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊株からのマーカー領域の除去

実施例5では、遺伝子破壊株の染色体DNA上に存在するマーカー領域を除去するためのマーカー除去ベクターを構築し、それを用いて、実施例2で作出したA・オリゼ

50 アルカリプロテアーゼ遺伝子破壊株（1764-6-5株）から

マーカー領域を除去した。

【0137】(1) マーカー除去ベクターの構築

マーカー除去ベクターを構築した。SalIとXbaIで処理したpOliAlp-1を、0.7%アガロースゲル電気泳動により分離した後、約7kbの断片を切り出し、QIAquickGel Extraction Kit(キヤゲン社製)を用いて精製した。精製した断片を、DNAligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてセルフライゲーションさせ、プラスミドpAlpdelとした。

【0138】(2) マーカー除去ベクターを用いたマーカーの除去

pAlpdelを鋳型に、プライマー15およびプライマー16を用いてPCRを行い(94°C 2分 1サイクル、94°C 30秒 55°C 30秒 72°C 6分 30サイクル、72°C 2分 1サイクル)、構造遺伝子領域の破壊により不活化されたアルカリプロテアーゼ遺伝子領域とo1ic31遺伝子領域を含むPCR断片を得た。得られたPCR断片を用い、特開平8-80196号公報記載の方法を用いて、1764-6-5株の形質転換を行った。なお、形質転換体選択の際に用いる重層プレートには、0.2%5-Fluoroorotic Acidおよび10mMウリジンを加えた。

【0139】得られた形質転換体のうち、UGプレートに点植した際、褐変が見られず、UTプレートで生育する1764-6-5-1株の染色体DNAを特開平8-80196号公報記載の方法を用いて取得し、ApaLI処理後、アルカリプロテアーゼ遺伝子プロモーター領域をプローブにサザン解析を行った。その結果、1764-6-5-1株では1764-6-5株で見られた約8kbのバンドが消失し、新たに、約2.3kbのバンド\*

\*が見られた。また、プローブとしてラッカーゼ遺伝子、pyrG遺伝子を用いて上記と同様にサザン解析を行ったところ、1764-6-5株で見られた約8kbのバンドは見られなかった。上記の通り、マーカー除去ベクターを用いて、染色体DNA上にマーカー領域の存在しないA・オリゼのアルカリプロテアーゼ遺伝子破壊株(1764-6-5-1株)が作出された。

【0140】

【発明の効果】本発明により、多核細胞において、効率的にターゲット部位を改変するための方法およびターゲティングベクターが提供された。さらにターゲット部位が改変された多核細胞が提供された。本発明の方法は、特に、

1. 遺伝子破壊株の作出法、
2. その発現の観察が困難あるいは発現していない遺伝子をターゲット部位とする場合の遺伝子ターゲティング法、
3. 相同組み換えの起こりにくい部位での遺伝子ターゲティング法、または
4. 所望のコピー数のターゲット部位を改変する方法、として有用である。本発明で提供される多核細胞は、各種産業分野で使用できるので非常に有用である。また本発明のターゲティングベクターは、上記の方法を実施する場合、および上記多核細胞を作出する際に有用である。

【0141】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KIKKOMAN CORPORATION

<120> METHOD FOR MODIFYING GENOMIC TARGET SITE OF  
MULTINUCLEATE CELL, TARGETING VECTOR FOR USE THEREIN,  
AND MODIFIED MULTINUCLEATE CELL

<130> P99-0308

<140>

<141>

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 1.

&lt;400&gt; 1

gaattctaga tctggggagc cgggtat

27

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 2.

&lt;400&gt; 2

gggggtttt agatctttga tgccgg

26

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 3.

&lt;400&gt; 3

atcgagtccca tcaaggctac cttg

24

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 4.

&lt;400&gt; 4

cggcgtcgcc agccatgttc g

21

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is

37

38

PCR primer 5.

&lt;400&gt; 5

gagactgact ctgtggatcc g

21

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt;

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 6.

&lt;400&gt; 6

cggtatccca gatcttgtgg c

21

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 7.

&lt;400&gt; 7

ggttgccccg atctgtaaac g

21

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 8.

&lt;400&gt; 8

cacccataqa tctggtcgga c

21

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 9.

39

40

&lt;400&gt; 9

tatcgataaq cttttgaaga g

21

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 10.

&lt;400&gt; 10

ctqgaggctt qcgcgcattt gtgtatq

26

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 11.

&lt;400&gt; 11

gacctacacgc qcgcgcgccta gcaacg

26

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 12.

&lt;400&gt; 12

tctcaactaga tctatttcattc c

21

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 13.

&lt;400&gt; 13

tgtctcaaaa gtcgggtcaa gagtatcc

28

<210> 14  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 14.

<400> 14  
a~~g~~cccc~~a~~aaa ~~q~~c~~g~~ac~~a~~c~~g~~gc ~~t~~ag~~c~~tt

26

<210> 15  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 15.

<400> 15  
c~~g~~ac~~g~~t~~t~~gta aa~~a~~ac~~g~~ac~~g~~gc ~~c~~

21

<210> 16  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 16.

<400> 16  
a~~c~~a~~g~~c~~t~~at~~g~~a c~~c~~at~~g~~att~~a~~c ~~g~~

21

<210> 17  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 17.

<400> 17  
g~~t~~ac~~c~~cc~~g~~ag~~t~~ g~~t~~c~~t~~g~~a~~ag~~t~~ g~~t~~

21

<210> 18

43

44

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 18.

&lt;400&gt; 18

ctaccccttq gtggccatac c

21

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 19.

&lt;400&gt; 19

atgcaqtccca tcaagggtac c

21

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 20.

&lt;400&gt; 20

caattttggc tagcctatgt q

21

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 21.

&lt;400&gt; 21

cgcccttggc cgcgagagct c

21

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 22.

&lt;400&gt; 22

cctcggataa gtcctctc

18

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 23.

&lt;400&gt; 23

tggggcgatttq agtggcaggc atttqa

26

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 24.

&lt;400&gt; 24

atgcacttagg cgcgcgttcc tccg

24

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Designated is  
PCR primer 25.

&lt;400&gt; 25

qaagggtgcag cgcgcgttcc gtct

24

【0142】

配列番号5：PCRプライマー5を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0143】

配列番号1：PCRプライマー1を示す。

配列番号6：PCRプライマー6を示す。

配列番号2：PCRプライマー2を示す。

配列番号7：PCRプライマー7を示す。

配列番号3：PCRプライマー3を示す。

配列番号8：PCRプライマー8を示す。

配列番号4：PCRプライマー4を示す。

50 配列番号9：PCRプライマー9を示す。

配列番号10: PCRプライマー10を示す。

【0144】

配列番号11: PCRプライマー11を示す。

配列番号12: PCRプライマー12を示す。

配列番号13: PCRプライマー13を示す。

配列番号14: PCRプライマー14を示す。

配列番号15: PCRプライマー15を示す。

【0145】

配列番号16: PCRプライマー16を示す。

配列番号17: PCRプライマー17を示す。

配列番号18: PCRプライマー18を示す。

配列番号19: PCRプライマー19を示す。

配列番号20: PCRプライマー20を示す。

【0146】

配列番号21: PCRプライマー21を示す。

配列番号22: PCRプライマー22を示す。

配列番号23: PCRプライマー23を示す。

配列番号24: PCRプライマー24を示す。

配列番号25: PCRプライマー25を示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】この図は、アルカリプロテーゼ遺伝子破壊用ベクターpEEB7の構築を示す。

【図2】この図は、形質転換体1764-66株からシングルコロニー単離された14株（レーン1～14）のサザン分\*

\* 分による核の状態を示す。（A）はアルカリプロテーゼ遺伝子プロモーター領域をプローブに使用した場合であり、一方（B）はタンナーゼ遺伝子ターミネーター領域をプローブに使用した場合である。図中、hostは宿主であるA・オリゼ1764株を、またMはマーカーを示す。

【図3】この図は、コピー数コントロール用マーカーの発現（GAプレート上での褐変の程度）を指標にして状態の異なる核をもつ株を選択できることを示している。

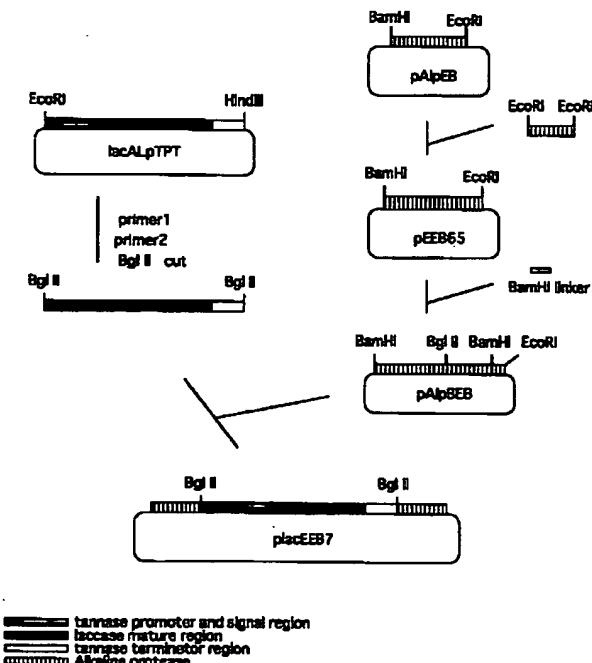
1から14の株の各々について褐変の程度は細胞内のラッカーゼ遺伝子のコピー数を反映している。

【図4】アルカリプロテーゼ遺伝子破壊用ターゲティングベクターpAlp8-8の構築を示す。図中、Tantpはタンナーゼプロモーター、Tantはタンナーゼターミネーター、lacはラッカーゼ遺伝子、Alpはアルカリプロテーゼ遺伝子、pyrGはオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子、oliC31はオリゴマイシン耐性ATPシンターゼサブユニット9遺伝子をそれぞれ示す。

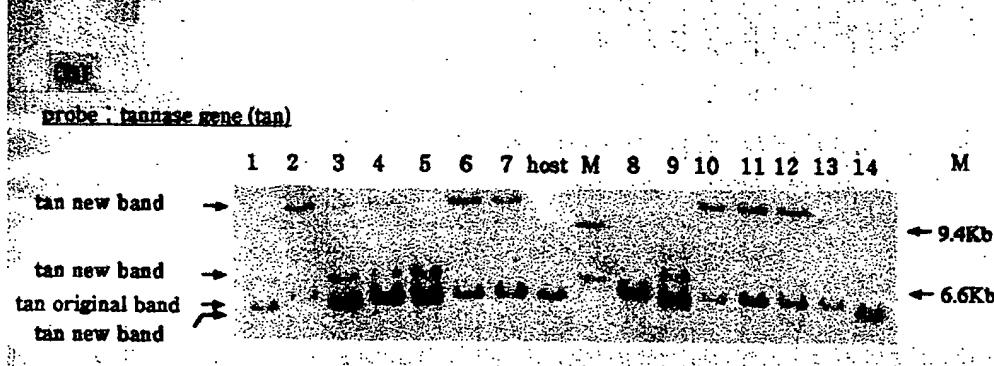
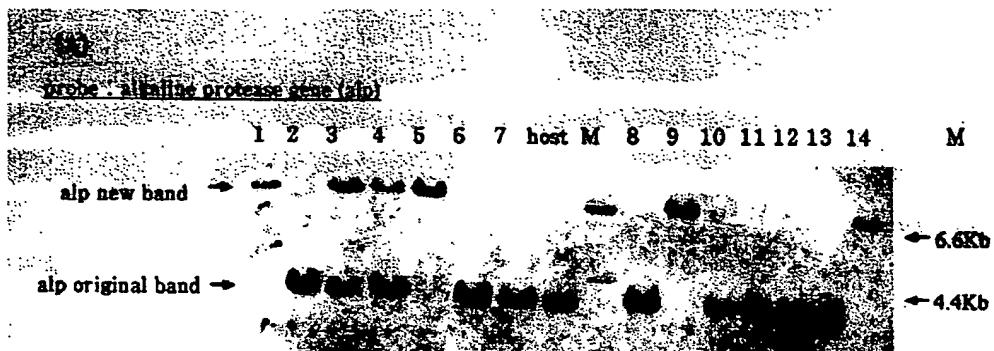
【図5】pksA遺伝子破壊用ターゲティングベクターpdpkSA-38の構築を示す。図中、Tantpはタンナーゼプロモーター、Tantはタンナーゼターミネーター、lacはラッカーゼ遺伝子、pksAはポリケタイドシンターゼ遺伝子、pyrGはオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子、oliC31はオリゴマイシン耐性ATPシンターゼサブユニット9遺伝子をそれぞれ示す。

20 20 【図1】この図は、アルカリプロテーゼ遺伝子破壊用ベクターpEEB7の構築を示す。

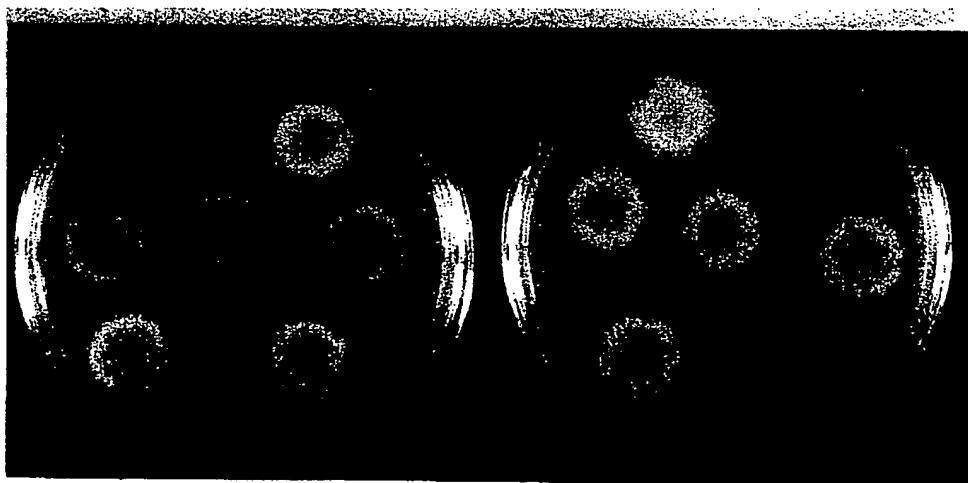
【図1】



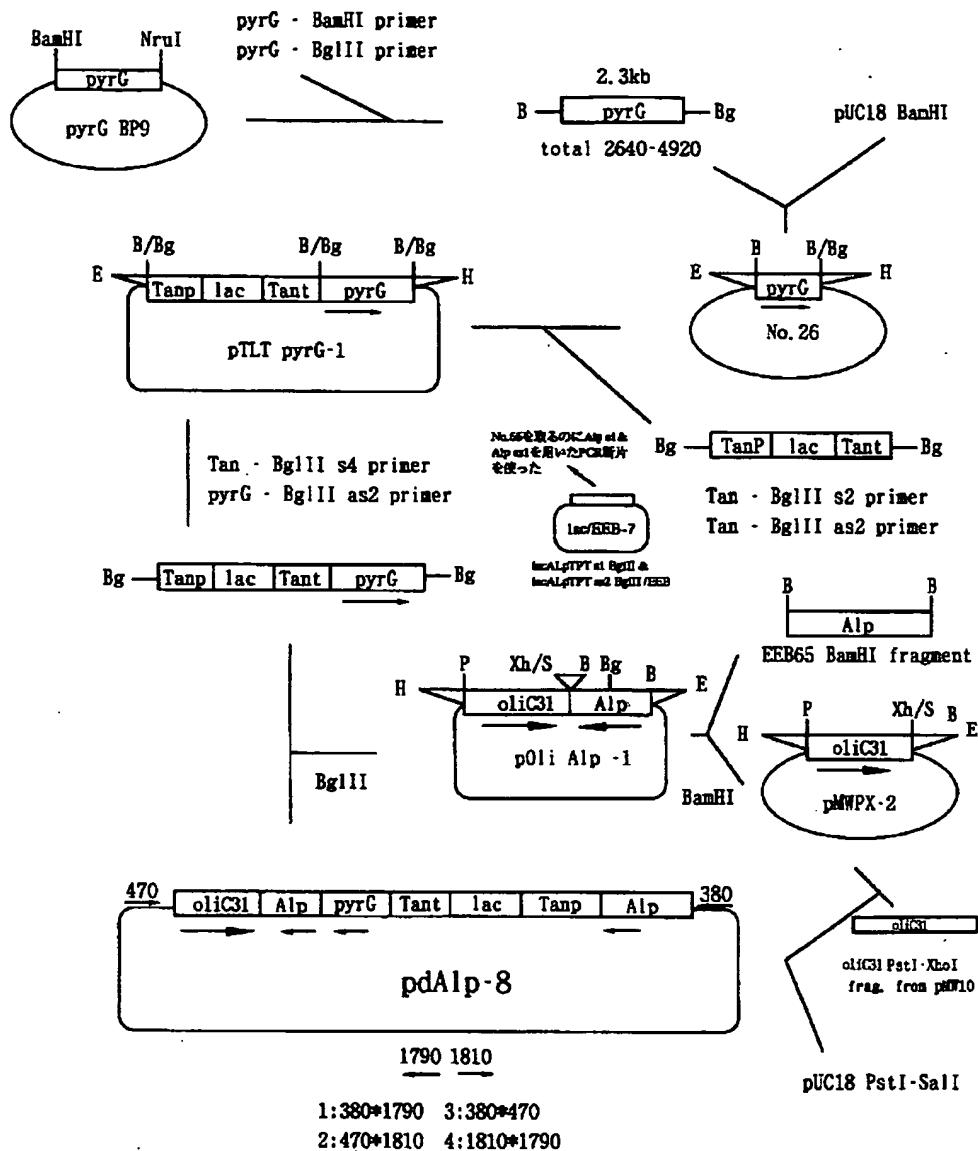
[図2]



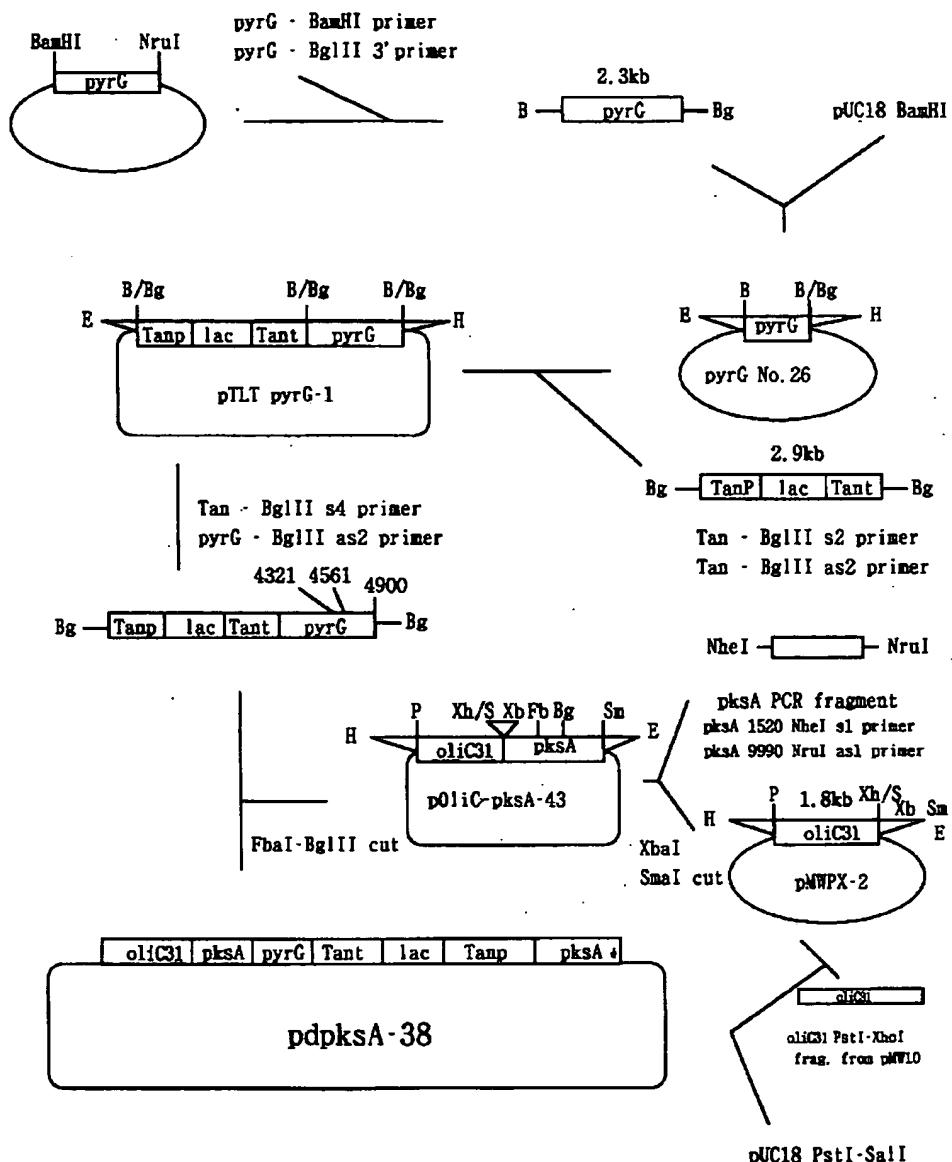
[図3]



[図4]



[図5]



フロントページの続き

(72)発明者 高橋 理

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内

(72)発明者 海附 玄龍

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内

(72)発明者 阿部 敬悦

宮城県仙台市青葉区川内元支倉35 2 -  
101

F ターム(参考) 4B024 AA03 AA05 AA20 CA02 CA09  
CA20 DA06 DA11 EA04 FA02  
FA07 FA10 FA18 FA20 HA13  
HA14  
4B065 AA60X AA60Y AA63X AB01  
AC14 AC20 BA02 BA16 BA25  
BD50 CA42 CA60